

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Petr Kašík

**Vliv sezóny na mitochondriální bobtnání srdce potkana po chladové
aklimaci**

The effect of season on mitochondrial swelling of rat heart after cold acclimation

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
RNDr. Daniela Horníková, Ph.D.

Konzultant:
Doc. RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2020

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, za její trpělivost, rady a zkušenosti, které výrazně pomohly jak při psaní práce, tak při práci v laboratoři. Dále mé díky patří doc. RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za veškeré rady, kterých se mi dostalo při odborných konzultacích. Poděkování patří také Mgr. Anetě Benešové a Mgr. Pavlu Vebrovi za pomoc s prací v laboratoři a s manipulací s laboratorními zvířaty.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým nejbližším za jejich oporu v rámci celého mého magisterského studia.

Abstrakt

Riziko úmrtí ve spojitosti s kardiovaskulárními onemocněními je zvýšeno během zimních měsíců a vystavením organismu akutnímu chladovému stresu. V poslední době se však ukazuje, že některé modely chladové aklimace mohou působit kardioprotektivně. Práce se zabývá vlivem akutní a chronické chladové aklimace na mitochondriální bobtnání srdce potkana. Mitochondriální bobtnání je mj. způsobeno větším vtokem Ca^{2+} do mitochondrií především během ischemicko-reperfúzního poškození. Tím se otevírá mitochondriální pór přechodné propustnosti, což může vyústit v prasknutí mitochondrií, a způsobit buněčnou smrt. Nižší míra mitochondriálního bobtnání pak poukazuje na větší odolnost mitochondrií. Výsledky práce ukazují snížené mitochondriální bobtnání po akutní chladové expozici i chronické chladové aklimaci.

Klíčová slova: *chlad, mitochondrie, Ca^{2+} ionty, bobtnání, MPTP, myokard, ROS, ischemie*

Abstract

Risk of death from cardiovascular disease is substantially increased throughout winter season and by exposure of organism to acute cold stress. However, several studies have suggested that some cold acclimation models could act cardioprotectively. The thesis is focused on effects of acute and chronic cold acclimation on swelling of rat heart mitochondria. Mitochondrial swelling is, besides other things, caused by massive influx of Ca^{2+} into the mitochondria especially during ischemia-reperfusion injury. By that, mitochondria permeability transition pore is being opened and subsequently, this could end up in mitochondrial burst and cell death, eventually. Lower rate of mitochondrial swelling indicates greater mitochondrial resistance. The results express higher mitochondrial resistance after acute cold exposure and chronic cold acclimation.

Key words: *cold, mitochondria, Ca^{2+} ions, swelling, MPTP, myocardium, ROS, ischemia*

Seznam zkratek

ADH	antidiuretický hormon
AIP	autocamtid - 2 - příbuzný inhibiční peptid
ANT	adenin nukleotidový transportér
AQP8	akvaporin 8
ATP	adenosintrifosfát
BAD	Bcl-2 asociovaný agonista buněčné smrti
BAT	hnědá tuková tkáň
BAX	Bcl-2 asociovaný X protein
Bcl-2	protein lymfomu B buněk 2
CaMK	kalmodulin dependentní proteinkináza
CICR	vápníkem indukované vápníkové uvolnění
CK	kreatinkináza
CR	kalorická restrikce
CsA	cyklosporin A
CyP-D	cyklofilin D
FFA	volné mastné kyseliny
GSH	glutathion
GSK-3β	glykogen syntáza kináza 3 β
HKI, II	hexokináza I, II
HPA	osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny
HSP 72	protein teplotního šoku 72
HSP-FRET	HSP – protein 33 „fluorescence resonance energy transfer“
IF1	ATPázový inhibiční faktor 1
IMM	vnitřní mitochondriální membrána
IL1	interleukin 1
I/R	ischemicko-reperfúzní poškození
JAK	Janus kinázy
JNK	c-Jun N-terminální kináza
KHE	mitochondriální K ⁺ /H ⁺ kanál
MAO-A	monoaminoxidáza A
MAPK	mitogen aktivované protein kináza

mBK_{Ca}	mitochondriální Ca ²⁺ senzitivní draslíkový kanál
MCU	mitochondriální kalciový uniporter
mHCX	mitochondriální Na ⁺ /Ca ⁺ výměník
MICU1	mitochondriální Ca ²⁺ uptake protein 1
mitoK_{ATP}	mitochondriální K _{ATP} kanál
mNHE	Na ⁺ /H ⁺ výměník
mNCX	mitochondriální H ⁺ /Ca ²⁺ výměník
MPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti
mtCK	mitochondriální kreatinkináza
NA	noradrenalin
NDUFS1	NADH: ubiquinon oxidoreduktáza 1
PAO	fenylarsin oxid
PiC	fosfátový přenašeč
PI3K	fosfatidyl inositol 3 kináza
PKC	proteinkináza C
OMM	vnější mitochondriální membrána
RaM	rychlý mitochondriální vápníkový uptake
ROS	volné kyslíkové radikály
SOD	superoxid dismutáza
SR	sarkoplazmatické retikulum
STAT	signální transduktor a aktivátor transkripce
TAT-HKII	derivát HKII
TG	triglycerid
TIM	translokáza vnitřní mitochondriální membrány
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
TOM	translokáza vnější mitochondriální membrány
VDAC	napětově ovládaný aniontový kanál
UCP	odpřahující proteiny

Obsah

1. Úvod	10
2. Vliv chladu na savčí organismus	11
3. Ischemicko-reperfúzní poškození	12
3.1 Fyziologické mechanismy provázející I/R poškození	13
3.2 Buněčné mediátory I/R poškození	14
3.2.1 Ca^{2+} přetížení	14
3.2.2 Aktivace signálních drah zahrnující proteinkinázy	15
3.2.3 Dysfunkce mitochondrií	16
3.3 Kardioprotektivní modely v I/R poškození	16
3.3.1 Kardioprotekce navozená cvičením	16
3.3.2 Kardioprotekce navozená kalorickou restrikcí	17
3.3.3 Kardioprotekce navozená hypoxií	17
4. Struktura mitochondrií a jejich funkce	18
4.1. Mitochondriální membránový potenciál	19
4.2. Mitochondriální pór přechodné propustnosti (MPTP)	19
4.2.1 MPTP Struktura	20
4.2.1.1 Struktury MPTP lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně	20
4.2.1.2 Struktury MPTP lokalizované na vnější mitochondriální membráně	21
4.2.2 Fyziologická funkce MPTP	22
4.3 Otevření MPTP a jeho inhibice	22
4.3.1 Ischemický conditioning	23
4.3.1.1 Vliv conditioningu na tzv. pasivní a aktivní způsoby otevření MPTP	24
4.3.1.1.1 Pasivní inhibice otevření MPTP	24
4.3.1.1.2 Aktivní inhibice otevření MPTP	24
4.3.1.1.2.1 Působení HKII a GSK-3 β a jeho modulace signální drahou PI3K/Akt	24
4.3.1.1.2.2 Mitochondriální K_{ATP} kanál	25
4.3.1.1.2.3 Signální dráha JAK/STAT a STAT3	26
4.3.2 Farmakologická inhibice otevření MPTP	26
5. Mitochondriální bobtnání	27
5.1 Mechanismus bobtnání a jeho důsledky	27
5.2 Mitochondriální bobtnání a způsoby měření	29
6. Cíle diplomové práce	29
7. Materiál a metody	30
7.1 Laboratorní zvířata a jejich aklimace	30

7.2. Odběr tkáně a její zpracování	31
7.3 Izolace mitochondrií	31
7.4 Mitochondriální bobtnání.....	31
7.5 Statistické vyhodnocení dat.....	32
8. Výsledky	33
9. Diskuse.....	43
10. Závěr	47
11. Seznam literatury	48
12. Přílohy	63

1.Úvod

Kardiovaskulární onemocnění představují jednu z hlavních příčin úmrtí ve světě i v České republice. V řadě případů za to může nevhodná strava, kouření, nebo nedostatečný pohyb. Jedním z důvodů, který je v této souvislosti často zkoumán, je stres. Stresová zátěž v moderní době spočívá v častých změnách teploty (např. přechodem z klimatizovaných prostor do teplého prostředí), narušení cirkadiánních rytmtů a dalších faktorů. Sezónně je obecně prokázána zvýšená úmrtnost v letních i zimních měsících při extrémních výkyvech teplot. V zimě navíc může hrát roli prudké krátkodobé střídání teplot, které je doprovázené dalšími riziky zimních měsíců, jako jsou např. epidemie některých onemocnění. Spuštěním termoregulačních mechanismů dochází ke zvýšené aktivitě sympatiku, renin-angiotensinového systému a dalších navazujících drah. Při chronické chladové aklimaci v nízkých teplotách ($\pm 5^\circ\text{C}$) je většinou pozorováno zvýšení krevního tlaku, tachykardie či srdeční hypertrofie.

Na druhou stranu může být chlad využíván jako prevence či terapie některých poruch. Řízená hypotermie (snížení teploty těla), zpomaluje metabolismus buněk, a díky tomu vykazuje velice dobré terapeutické účinky např. při operacích srdce. Při ischemicko-reperfúzním poškození (I/R) dochází v reperfúzní fázi k porušení metabolismu mitochondrií, zvýšené tvorbě volných kyslíkatých radikálů (ROS) a zvýšenému vtoku Ca^{2+} . To může vést k otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (MPTP), bobtnání mitochondrií a vyústit ve spuštění apoptózy. Cílené ochlazení organismu dokáže zmíněné procesy zpomalit. Odolnost mitochondrií zvyšují i některé kardioprotektivní modely, jako je pravidelné cvičení, kalorická restrikce či hypoxie. V naší laboratoři byl nedávno zaveden kardioprotektivní model mírné chladové aklimace, která snižuje velikost infarktu. Cílem práce je popsat vliv třech akutních a jednoho chronického modelu mírné chladové expozice/aklimace ($\pm 8^\circ\text{C}$) na mitochondriální bobtnání u srdce potkana s ohledem na roční období (léto/zima).

2. Vliv chladu na savčí organismus

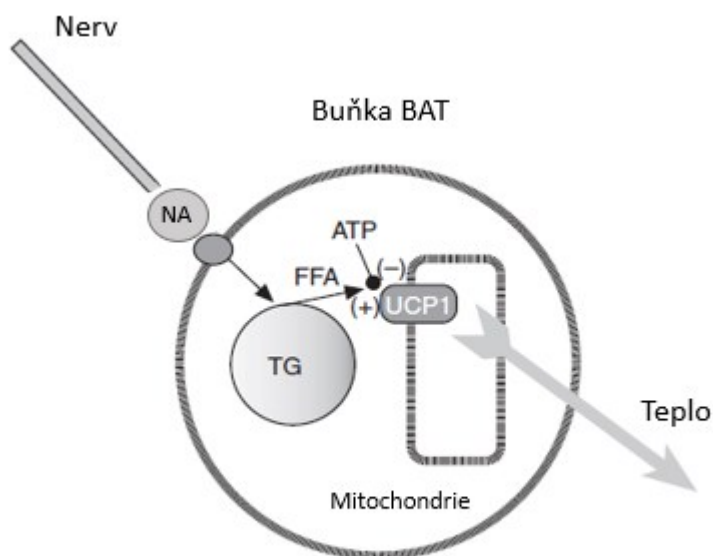
Homoiotermní organismy udržují stálou vnitřní tělesnou teplotu. Vnější teplotní změna aktivuje termoregulační mechanismy řízené z hypotalamu. Jejich činnost je zajištěna senzorickým obloukem tvořeným chladovými a teplovými receptory kůže, eferentními drahami, termoreceptory hypotalamu a aferentními drahami vedoucími k orgánům, které generují teplo. U většiny homoiotermních organismů můžeme rozlišit termogenezi na třesovou (ve svalech) a netřesovou (chemickou; v hnědé tukové tkáni), (Banet et al., 1978).

Svalový třes je způsoben aktivací dorsomediální části zadního hypotalamu a u člověka představuje hlavní obranu v nízkých teplotách. Dále se organismus brání ztrátám tepla vasokonstrikcí, která je zapříčiněná aktivací sympatiku, což vede ke zvýšení srdečního rytmu a krevního tlaku. Svou roli v termoregulaci hraje i osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA). Stimulací sekrece kortikosteronu zvyšuje metabolismus a podporuje tvorbu tepla (Leppäluoto, et al., 1973). Dále zabraňuje ztrátám tepla např. pomocí antidiuretického hormonu (ADH), který brání ztrátám vody.

Netřesová termogeneze je ovládána sympatikem pomocí stimulace β_3 -adrenoreceptoru noradrenalinem (NA), (Hsieh a Carlson, 1957; Zhao et al, 1998). Dochází k tvorbě hnědé tukové tkáně (angl. brown adipose tissue; BAT), zmnožení mitochondrií a zvýšené expresi odpřahujících proteinů (angl. uncoupling protein; UCP), (Jacobsson et al., 1994).

Míra stresu, kterou snížená teplota představuje, závisí na intenzitě a délce trvání. Pokud se nejedná o extrémní chlad dochází postupně k aklimaci zvířete. Svalový třes je první z mechanismů, který je spuštěn jako krátkodobá reakce na snížení teploty. Pokud chladné podmínky přetrvávají, zvíře se aklimuje, což vede k odeznění třesové termogeneze a nástupu netřesové termogeneze (Barnett, 1965; Hart et al., 1956). Klíčovou strukturou pro netřesovou termogenezi je, BAT. Jeho růst způsobuje zvýšená aktivita sympatiku (Foster a Frydman, 1978). BAT disponuje značnou kapacitou pro zvýšení průtoku krve, pokud je stimulován NA (Rothwell a Stock, 1981). To je důležité pro větší produkci tepla, která je zprostředkována UCP proteiny. UCP proteiny, lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně, dokážou odpřáhnout proces oxidativní fosforylace a syntézy adenosintrifosfátu (ATP). Gradient H^+ se pak nevyužívá pro syntézu ATP, ale pro produkci tepla. UCP proteiny jsou regulovány volnými mastnými

kyselinami (FFA), které je aktivují a purinovými nukleotidy, které je inhibují (viz obrázek 1), (Nedergaard et al., 2001).



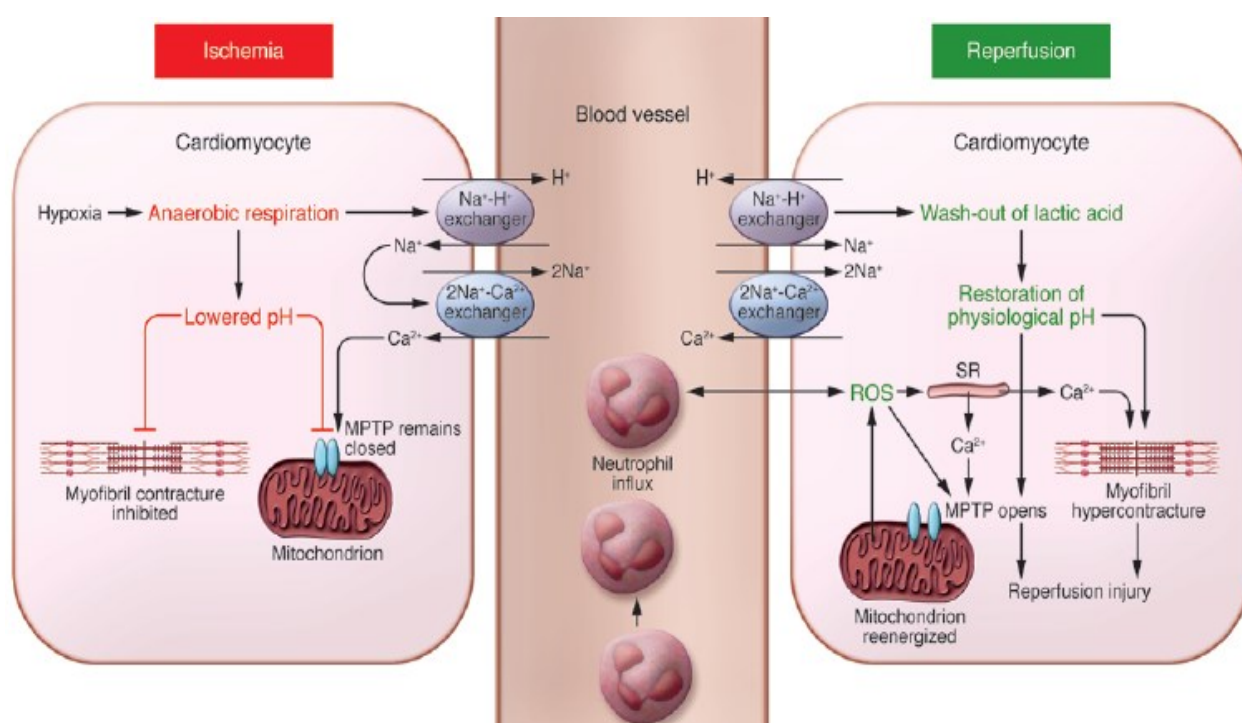
Obrázek 1: Schéma funkce hnědé tukové tkáně (BAT). Noradrenalin (NA) stimuluje růst BAT a zvyšuje uvolnění volných mastných kyselin (FFA) z triglyceridů (TG). FFA poté aktivují UCP1 proteiny. Jejich činností dochází k rozštěpení dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace a uvolňuje se energie v podobě tepla (převzato a upraveno z Cannon a Nedergaard, 2010).

3. Ischemicko-reperfúzní poškození

I/R doprovází typicky infarkt myokardu nebo mozkovou mrtvici. Při ischemii je přerušena přívod krve do tkáně. Je narušen metabolismus buněk a v nejzávažnějším případě dojde k apoptóze, či nekróze. Čím déle trvá ischemie a následná reperfúze, tím větší je poškození tkáně. I přesto, že rychlé obnovení průtoku krve (reperfúze) v postižené tkáni zajistí přísun kyslíku a substrátů pro aerobní produkci ATP, přináší řadu komplikací. Mechanismy reperfúzního poškození jsou komplexní. Zahrnují tvorbu ROS, Ca^{2+} přetížení, otevření MPTP a zvýšenou zánětlivou odpověď. Rizika vedoucí k I/R souvisí s pokročilým věkem, hypertenzí, obezitou, kouřením nebo diabetem I. a II. typu (Kalogeris, 2012; Rehni a Dave, 2018).

3.1 Fyziologické mechanismy provázející I/R poškození

Kvůli nedostatku kyslíku při ischemii dochází v buňce ke zvýšení anaerobního metabolismu a vyšší tvorbě laktátu. V důsledku toho se snižuje pH buňky pod 7,0. Následně se kvůli zvýšené činnosti Na^+/H^+ výměníku a inaktivaci Na^+/K^+ ATPázy (deplecí ATP) v buňce hromadí velké množství Na^+ . To doprovází Ca^{2+} přetížení, jelikož je přerušeno výtoku Ca^{2+} z buňky. Všechny tyto faktory dohromady způsobují nižší kontraktilitu myokardu (Hausenloy a Yellon, 2013), (viz obrázek 2).



Obrázek 2: Levá strana obrázku popisuje ischemii myokardu, při které dochází k nedostatku kyslíku a změně na anaerobní metabolismus. Ten způsobí hromadění laktátu a pokles v intracelulárním pH. Vlivem zvýšeného výtoku H^+ se zvýší koncentrace Na^+ a Ca^{2+} uvnitř buňky. Kyselé prostředí zabrání otevření MPTP a kontrakci myokardu. V reperfúzi (pravá strana obrázku) se reaktivuje elektron-transportní řetězec a zvýší se produkce ROS. Ty mohou pocházet i z jiných zdrojů, jako je např. NADPH oxidáza z neutrofilů. Dochází k otevření MPTP a dysfunkci sarkoplazmatického retikula (SR), což vede v buňce k Ca^{2+} přetížení a hyperkontrakci. Reaktivací Na^+/H^+ výměníku navíc dochází k navrácení pH na původní hodnoty a zrušení inhibičního efektu na MPTP. Otevření MPTP napomáhá i mitochondriální membránový potenciál, který způsobuje vtok Ca^{2+} do mitochondrií (převzato a upraveno z Hausenloy a Yellon, 2013).

Výsledná závažnost poškození závisí na délce trvání ischemie. Obecně se dá rozdělit do tří fází. Reperfúze po ischemii trvající 1-5 minut způsobuje komorové arytmie, které většinou samy odezní.

Pokud ischemie trvá déle (5-20 minut) dojde v postischemické fázi k tzv. omráčení srdce. Jedná se o krátkou kontraktlní dysfunkci bez ireverzibilního poškození (Braunwald a Kloner, 1982), která je následkem tvorby ROS, přechodnému zvýšení Ca^{2+} a snížené odpovědi kontraktlního aparátu na Ca^{2+} . Svou úlohu zde má i aktivace kalpainů, které štěpí proteiny myofibril (Urthaler et al., 1997). V opakované ischemii může navíc dojít ke stavu tzv. hibernujícího myokardu (Elsässer et al., 1997). Stav, kdy se myocyty dostanou do neonatálního stadia, je způsoben opakovanými epizodami omráčení srdce (Kim et al., 2003). To způsobí metabolický obrat, sníží se kontraktlní funkce, energetická spotřeba a energie je získávána z glykolýzy. Díky tomu může srdce lépe přestát sníženou dodávkou kyslíku a živin. Lze pozorovat zvýšený výskyt polymorfických mitochondrií, lysozomů a snížení počtu myofibril. Hibernující myokard může být zpětně změněn na původní pomocí obnoveného krevního toku, který reprogramuje a normalizuje expresi proteinů (Slezák et al., 2009).

Posledním stadiem je nevratné poškození a smrt buněk, které následuje po delší než 20minutové ischemii. Po této době dochází při reperfúzi k vysokému oxidativnímu stresu a dysfunkci mitochondrií, Ca^{2+} přetížení, otevření MPTP a aktivaci apoptózy (viz kap. 3.2 a kap. 4.2). Přesné mechanismy kdy a jak se z reverzibilního poškození stane ireverzibilní, nejsou známy.

3.2 Buněčné mediátory I/R poškození

Během I/R poškození dochází v buňce k zásadním změnám. Mezi hlavní buněčné mediátory I/R poškození patří Ca^{2+} přetížení, signální kaskády zahrnující proteinkinázy a dysfunkce mitochondrií.

3.2.1 Ca^{2+} přetížení

Ischemie způsobuje zvýšený vtok Na^+ , které s sebou pomocí $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku ženou do buňky Ca^{2+} . Cytosolická hladina Ca^{2+} je dále zvýšena během reperfúze. Jedním z mechanismů jak vysokou hladinu Ca^{2+} snížit je jejich transport do mitochondrií pomocí mitochondriálního Ca^{2+} uniportu (MCU), (Montero et al., 2000). Dalším cílem pro Ca^{2+}

jsou kalpains. Jedná se o cysteinové proteázy aktivované zvýšenou hladinou Ca^{2+} , které degradují řadu intracelulárních proteinů. Ukazuje se, že inhibice kalpainů působí protektivně a snižuje poškození po I/R (Hernando et al., 2009). Pokud zůstává hladina Ca^{2+} vysoká po delší dobu, dochází k otevření MPTP a následné aktivaci apoptózy (viz kap 4.2).

3.2.2 Aktivace signálních drah zahrnující proteinkinázy

I/R poškození se účastní některé proteinkinázy, které se uplatňují při signalizaci, vývoji, růstu a proliferaci buněk. Jedná se o signální dráhy mitogen aktivovaných kináz (MAPK), proteinkinázy C (PKC), či kalmodulin dependentní proteinkinázy (CaMK).

Z rodiny PKC byl potvrzen zásadní vliv aktivace PKC δ a PKC ϵ při I/R poškození (Strasser et al., 1999). Použitím peptidů během reperfúze, které dokážou inhibovat zmíněné proteinkinázy, bylo dosaženo sníženého poškození I/R na prasečím modelu (Inagaki et al., 2003). Naopak aktivací PKC δ během I/R byla spuštěna apoptóza přes pro-apoptotické proteiny BAD (angl. Bcl-2 Associated Agonist Of Cell Death), (Murriel et al., 2004).

Zvýšené množství intracelulárních Ca^{2+} během I/R může aktivovat CaMK. V ischemickém srdci byla zaznamenána zvýšená aktivita CaMKII (Uemura et al., 2002; Netticadan et al., 1999). Její farmakologická inhibice CaMKII inhibičním peptidem (AIP) chrání buňku před nekrotizací a snižuje aktivitu pro-apoptotických proteinů (kaspáza-3, BAX), (Vila-Petroff et al., 2007).

Inhibice c-Jun N-terminální kinázy (JNK) ze skupiny MAPK může zmírnit I/R poškození v řadě orgánů včetně srdce. Menší poškození po I/R bylo potvrzeno např. u JNK1 a JNK2 deficientních myší (Kaiser et al., 2005). Zajímavostí je popsána jejich dvojí role. U stejných buněk za podobných podmínek totiž došlo k nižšímu poškození i po aktivaci JNK. Podobné výsledky byly získány i při pokusech na různých orgánech sledujících činnost p38 MAPK (Yusof et al., 2009; Li et al., 2006). Cílem pro tyto kinázy mohou být zánětlivé cytokiny, jako je tumor nekrotizující faktor α (TNF α), nebo interleukin 1 (IL1), které mají svou úlohu v I/R poškození. Důležitý je jejich vliv na funkci mitochondrií, zejména na aktivaci/inaktivaci mitochondriálních anti-apoptotických, či pro-apoptotických proteinů (De Chiara et al., 2006; Fan et al., 2000).

3.2.3 Dysfunkce mitochondrií

Mitochondrie mají klíčovou úlohu v mechanismu I/R poškození. Kvůli nedostatku kyslíku je omezena funkce elektron-transportního řetězce, a nedochází k tvorbě ATP. To je navíc hydrolyzováno pro udržení stabilního mitochondriálního membránového potenciálu. Při ischemii se v mitochondriích zvyšuje tvorba ROS (především tvorba superoxidu v komplexech I a III), která v reperfúzi ještě zesílí, a proto nemůže být kompenzována antioxidačními mechanismy. Kvůli tomu dochází k peroxidaci lipidů, kovalentní modifikaci proteinů a oxidaci mitochondriální DNA.

Důležitost produkce ROS potvrzují některé studie sledující protektivní efekt zvýšené antioxidační obrany. U transgenních myší s nadměrnou expresí superoxid dismutázy 2 (SOD2) byl potvrzen mírnější dopad I/R poškození (Chen et al., 1998). Ke zvýšení aktivity SOD2 a snížení míry apoptózy může dojít skrze protein teplotního šoku 72 (HSP72), (Suzuki et al., 2002). Snížení oxidačního stresu bylo zaznamenáno i u myší s genetickou delecí monoaminoxidázy A (MAO-A), jejíž činností vzniká H_2O_2 (Kaludercic et al., 2011). Podobně může být zmenšeno I/R poškození i farmakologickou inhibicí monoaminoxidáz (Kiray et al., 2008).

Přetížení Ca^{2+} a produkce ROS dohromady způsobí otevření MPTP (viz kap. 4.2). Dlouhodobé otevření póru může způsobit mitochondriální bobtnání, rupturu mitochondrií a aktivaci apoptózy. Zmíněné mechanismy ovlivňují i některé kardioprotektivní modely.

3.3 Kardioprotektivní modely v I/R poškození

Studii, které se zabývají kardioprotektivními modely je celá řada. Vzhledem k povaze práce jsou důležité protekce související s ovlivněnou funkcí mitochondrií, jako je cvičení, kalorická restrikce a hypoxie.

3.3.1 Kardioprotekce navozená cvičením

Pravidelné cvičení chrání srdce proti I/R poškození (Brown et al., 2005; Bowles a Stames, 1994; Demirel et al., 2001). Opakované periody zvýšeného fyzického výkonu chrání srdce před I/R arytmiím (Hamilton et al., 2004), snižují pravděpodobnost výskytu „omráčeného“ myokardu (Hamilton et al., 2001) a snižují velikost poranění po infarktu myokardu (Yamashita et al., 1999). Potenciálními buněčnými mechanismy, které vedou

ke kardioprotekci může být zvýšená produkce HSP (Powers et al., 1998), nebo zvýšená aktivita SOD (Quindry et al., 2005) a dalších antioxidačních mechanismů. Jedním z hlavních způsobů, jak cvičení ovlivňuje kardioprotekci, je změna fenotypu mitochondrií a změna exprese mitochondriálních proteinů (Lee et al., 2012). Mitochondrie jsou poté odolnější proti uvolnění cytochromu c, nebo přetížení Ca^{2+} (Kavazis et al., 2008). Zároveň dochází ke snížení exprese MAO-A, a tedy k nižší tvorbě ROS (Kavazis et al., 2009).

3.3.2 Kardioprotekce navozená kalorickou restrikcí

Kalorická restrikce (CR) odpovídá stavu, ve kterém je přijímáno menší množství energie se zachováním odpovídajícího příjmu proteinů a dalších živin tak, aby se zabránilo malnutrici. Při výzkumu se používají různé modely CR podle doby trvání, či míry restrikce. Bylo potvrzeno, že CR může působit kardioprotektivně skrze snížení oxidativního stresu, rychlejší obnovy glutathionu (GSH) a zastavení exprese prozánětlivých cytokinů (Chandrasekar et al., 2001). Melova studie (Melo et al., 2016) ukázala, že CR aplikovaná v prvních třech měsících života potkana, zlepšuje funkci myokardu a chrání srdce proti I/R poškození nejspíš pomocí snížení oxidativního stresu a zvýšením exprese HSP72. CR rovněž podporuje odolnost srdečních mitochondrií, a to deacetylací některých proteinů elektron-transportního řetězce, jako je např. NADH: ubiquinon oxidoreduktáza 1 (NDUFS1), (Shinmura et al., 2011).

3.3.3 Kardioprotekce navozená hypoxií

Modely simulující hypoxii jsou založeny na vystavení zvířete prostředí připomínající podmínky ve vysoké nadmořské výšce. Pokusná zvířata pak disponují větší odolností k I/R poškození. Prokazatelně větší odolností k I/R poškození pomocí sníženého Ca^{2+} přetížení disponovali potkani vystavení podmínkám simulujícím 3000 m.n.m. po dobu 42 dnů (5 h/den), (Ma et al., 2014). Protektivních výsledků dosáhl s podobným pokusem (5000 m.n.m., 42 dní, 6 h/den) ve své studii i Dong (Dong et al., 2003), který prokázal zvýšenou expresi anti-apoptotického Bcl-2 proteinu a snížení apoptózy. Hypoxie před normoxickou reperfúzí může působit protektivně skrze sníženou produkci ROS v mitochondriích a sníženou deplecí GSH (Serviddio et al., 2005). V tomto případě může záležet na modelu hypoxické expozice, jak ukázala studie Kašparové (Kašparová et al., 2015), kdy nebyla u modelu 23hodinové hypoxie následované

hodinovou reoxygenací po dobu 3 týdnů zaznamenána žádná změna v antioxidačních mechanismech. Naproti tomu další dva testované modely nepřerušované hypoxie a intermitentní hypoxie (8 h/den) vykazovaly kardioprotektivní účinky zvýšením exprese SOD2, glutathion reduktázy a thioredoxin reduktázy.

Kardioprotektivní působení hypoxie doprovází i vyšší exprese hexokinázy I a II (HKI, II), (Wasková-Arnoštová et al., 2015). Zároveň dochází ke zvýšení exprese a aktivity mitochondriální kreatinkinázy (mtCK), (Wasková-Arnoštová et al., 2014). Oba proteiny mají svou úlohu v regulaci otevření MPTP (viz kap. 4.2.1.2). Bylo navíc prokázáno, že chronická hypoxie může snížit senzitivitu póru k Ca^{2+} (Neckář et al., 2017).

4. Struktura mitochondrií a jejich funkce

Mitochondrie představují klíčovou organelu pro bioenergetické procesy v buňce. Představa o jejich struktuře byla poměrně dlouhou dobu zkreslená. Dnes víme, že nefungují jako uniformní entita, ale jako dynamická organela, která se může rozpadat, či naopak fúzovat. Mitochondrie se skládají ze dvou mitochondriálních membrán složených z fosfolipidů, mezi kterými je mezimembránový prostor. Vnitřní mitochondriální membrána (IMM) odděluje mezimembránový prostor a mitochondriální matrix.

Vnější mitochondriální membrána (OMM) je oproti vnitřní poměrně propustná. Přes OMM přechází molekuly pomocí porinů (např. VDAC, angl. voltage dependent anion channel; viz kap. 4.2.1.2) nebo pomocí komplexů translokázy vnější mitochondriální membrány (TOM), (Krimmer et al., 2001). Zároveň se na ni mohou exprimovat proteiny ovlivňující apoptózu, jako jsou pro-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 (BAX; angl. Bcl-2 associated X Apoptosis Regulator; BAD), které zároveň zvyšují propustnost membrány, což vede k vyloučení cytochromu c z mitochondrie (Nguyen et al., 1993). IMM tvoří tzv. kristy, které zvyšují její celkový povrch. To je důležité především pro vyšší výkonnost energetického metabolismu.

Na IMM se nachází komponenty dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace (komplexy I, II, III, IV a F_1F_0 ATP syntáza). Transport přes membránu je zajištěn pomocí komplexů translokázy vnitřní mitochondriální membrány (TIM), (Bauer et al., 2000)

Kromě zajištění většiny reakcí buněčného dýchání, fungují mitochondrie i jako zásobník pro Ca^{2+} (podobně jako endoplazmatické retikulum), nebo jako pufr při Ca^{2+} přetížení. Dokážou produkovat teplo pomocí UCP proteinů a plní zásadní funkci při

apoptóze, nebo nekróze. Pro správnou funkci mitochondrií je zapotřebí udržení stálého mitochondriálního membránového potenciálu, který bude vysvětlen v následující kapitole.

4.1. Mitochondriální membránový potenciál

Mitochondriální membránový potenciál je generován pumpami protonů H^+ komplexů I, III a IV a tento elektrochemický potenciál je zpětně využíván pro syntézu ATP. Úroveň membránového potenciálu a produkce ATP zůstává během standardních podmínek v buňce relativně stálá. Jeho hodnota se pohybuje mezi -150- -180 mV. Tyto hodnoty mohou být vychýleny činností některého z mnoha iontových kanálů IMM. Pokud změna přetrvává dlouho dochází k porušení mitochondriálního membránového potenciálu a aktivaci apoptózy (Gottlieb et al., 2003). Pro mitochondriální membránový potenciál jsou důležité dva proteiny lokalizované na IMM. Prvním z nich je adenin nukleotidový transportér (ANT), který mění ATP za ADP (Weidemann et al., 1970). Elektrogenní výměna ATP^{4-} za ADP^{3-} pomocí ANT hraje v některých případech svou roli v udržování mitochondriálního membránového potenciálu (LaNoue et al., 1978). Dalším důležitým proteinem je ATP syntáza, která může obrátit svou funkci, a udržovat tak mitochondriální membránový potenciál v podmínkách, kdy nefunguje respirační řetězec. Kvůli tomu dochází k velkým ztrátám ATP, kterým se mitochondrie brání pomocí ATPázového inhibičního faktoru 1 (IF1), (Venard et al., 2003). Proteiny ANT a ATP syntáza společně dále tvoří základ pro MPTP, který se také podílí na regulaci mitochondriálního membránového potenciálu.

4.2. Mitochondriální pór přechodné propustnosti (MPTP)

Mitochondrie velmi pevně regulují permeabilitu IMM především kvůli udržení produkce ATP a mitochondriálního membránového potenciálu. MPTP je vysokomolekulární kanál, který se otevírá především při I/R poškození a nadměrném oxidativním stresu. Způsobuje rozpřažení oxidativní fosforylace a mitochondriální bobtnání. Následně dochází ke spuštění apoptózy, či nekrózy. Potvrzuje se, že inhibice MPTP snižuje rozsah poškození mitochondrií. Nejčastěji se používá nespecifická inhibice pomocí cyklosporinu A (CsA). Specifický inhibitor zatím není znám, podobně jako přesná struktura MPTP.

4.2.1 MPTP Struktura

Molekulární struktura MPTP je doposud nejasná. V současnosti existuje několik úvah, jak by mohl pór vypadat. Proteiny, které ho tvoří se dají rozdělit do dvou hlavních skupin, podle toho, na které z membrán se nacházejí.

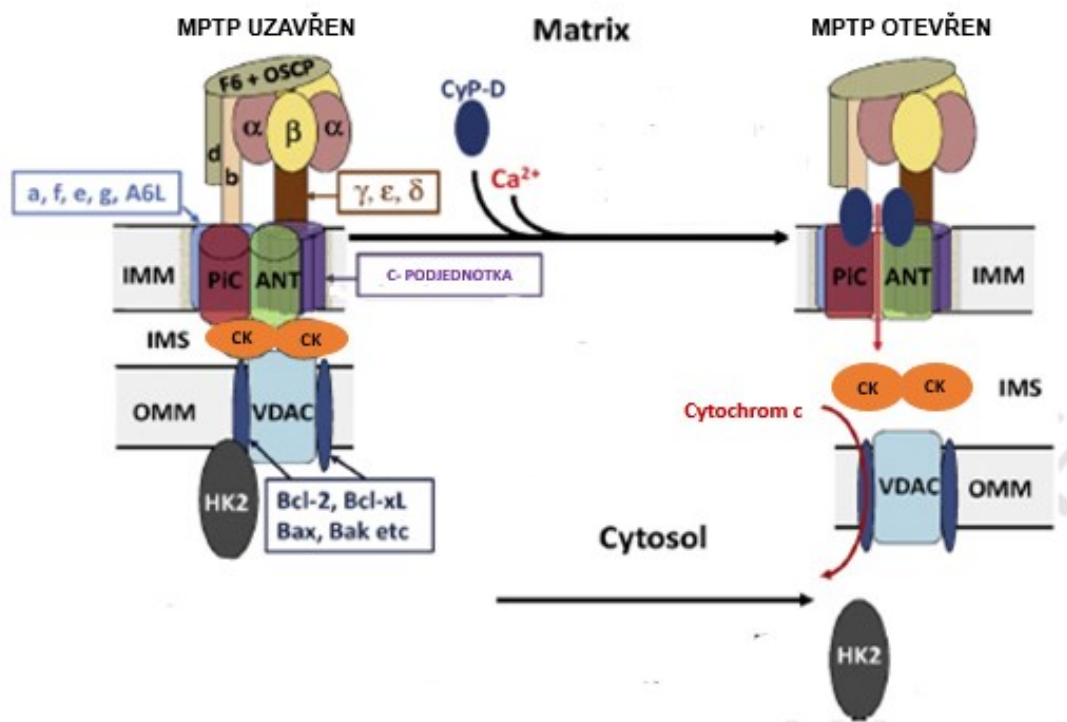
4.2.1.1 Struktury MPTP lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně

Strukturu póru se i přes intenzivní výzkum stále nepodařilo objasnit. Původní představy považovaly za stěžejní proteiny ANT a VDAC (viz obrázek 3), které měly tvořit pór mezi vnější a vnitřní membránou mitochondrií. Pozdější studie (Kokoszka et al., 2004; Baines et al., 2007) ukázaly, že obě struktury netvoří základ póru, ale účastní se jeho regulace.

Významnou roli při aktivaci MPTP hraje peptidyl prolyl cis-trans izomeráza, cyklofilin D (CyP-D). CyP-D zvyšuje sensitivitu póru pro Ca^{2+} (Connern a Halestrap, 1996), váže se na fosfátový přenašeč (PiC) a ANT, a způsobuje konformační změny vedoucí k otevření MPTP. To ukazuje např. podání karboxyatraktylosidu (toxický diterpen), který se váže na ANT a zvyšuje pravděpodobnost otevření póru, navíc podněcuje vazbu CyP-D na PiC (Leung et al., 2008). Vazba s PiC je dále důležitá pro fosfátovou aktivaci MPTP. Nedostatek CyP-D pak brání CsA v inhibici tvorby MPTP (Basso et al., 2005). Další výzkum ukazuje vazbu CyP-D na F_1F_0 ATP syntázu, kde moduluje její hydrolytickou aktivitu (Chinopoulos et al., 2011).

Podle novějších studií by mohla být hlavní strukturou tvořící MPTP c-podjednotka F_0 části F_1F_0 ATP syntázy. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} vede ke zvětšení c-podjednotky, jejímu odtržení od F_1 a k porušení propustnosti membrány (Alavian et al., 2014). K podobnému závěru dospěl i Giorgiův výzkum (Giorgio et al., 2013), avšak v obou případech bylo použito rekonstituovaných purifikovaných c-podjednotek. Autoři navíc dodávají, že k tvorbě MPTP je zapotřebí dalších proteinů. Modely struktury jsou tak pouze hypotetické. Jeden z nich byl vytvořený Halestrapem (Halestrap a Richardson, 2015), kde MPTP představuje F_1F_0 ATP syntáza, ANT a PiC. Jeho otevření je způsobeno zvýšenou koncentrací Ca^{2+} a zprostředkováno vazbou Cyp-D na PiC a ANT (viz obrázek 3). Tento model zatím představuje asi nejpravděpodobnější znázornění strukturu póru. Pro úplnost je třeba zmínit i zcela odlišnou hypotézu, kterou popisuje studie He a Lemasters

(He a Lemasters, 2001), ve které autoři předpokládají, že MPTP netvoří specifický protein, ale agregáty různých denaturovaných membránových proteinů.



Obrázek 3: Schématický model pravděpodobné struktury MPTP. Na levé straně je zavřený pór složený s PiC, ANT a F_1F_0 ATP syntázou na IMM a VDAC na OMM. Uzavřené konformaci přispívají regulační komponenty v podobě CK (kreatinkináza) a HKII. Konformační změny spojené se zvýšenou koncentrací Ca^{2+} způsobující otevření póru jsou urychleny pomocí CyP-D a deplecí c podjednotky ANT. Zároveň dochází k disociaci HKII a OMM začíná být propustná pro cytochrom c (převzato a upraveno z Halestrap a Richardson, 2015).

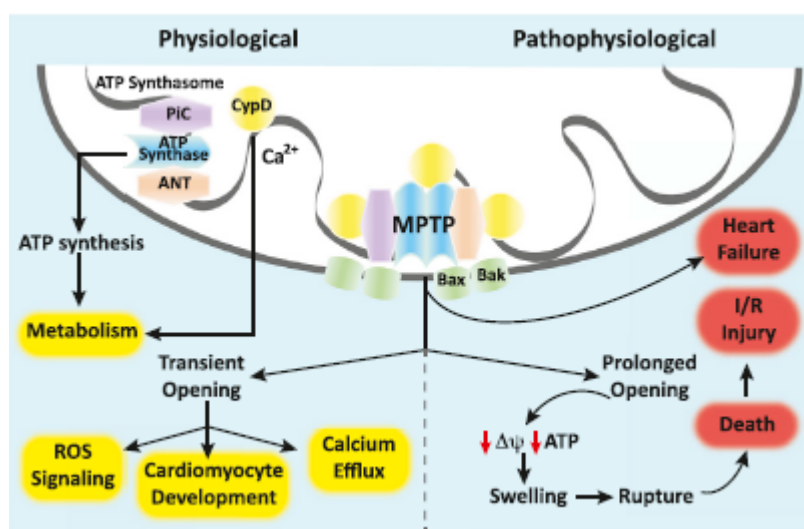
4.2.1.2 Struktury MPTP lokalizované na vnější mitochondriální membráně

V OMM je umístěn zmíněný VDAC, který ovlivňuje řadu fyziologických procesů v mitochondriích včetně transportu ATP, či respirace. Jeho interakce s HKII chrání buňku před vazbou pro-apoptotických proteinů BAX, vylitím cytochromu c a spuštěním apoptózy (viz obrázek 3). Disociace HKII způsobí depolarizaci membrány a otevření MPTP (Chiara et al., 2008). Uvolnění HKII může podnítit fosforylaci VDAC glykogen syntázou kinázou 3β (GSK- 3β), (Pastorino et al., 2005). Pravděpodobnost otevření póru naopak snižuje zvýšená exprese HKII, spojená s činností signální dráhy PI3K/Akt (fosfatidyl inositol 3 kináza/Akt), přesněji fosforylací VDAC pomocí PKC- ϵ (Sun et al.,

2007). Mechanismu otevření MPTP se účastní i další signální dráhy, které budou popsány v kapitole 4.3.1.1.2.

4.2.2 Fyziologická funkce MPTP

Vedle své funkce v I/R poškození a dalších stresových situací, podporuje MPTP i fyziologické procesy v mitochondriích (viz obrázek 4). Tomu nahrává i skutečnost, že za hlavní regulační komponenty jsou považovány ANT, PiC, F1Fo ATP syntáza (popř. VDAC kanál). Společně tvoří proteinový komplex s názvem ATP syntazom (Ko et al., 2003). Ztráta některého z těchto proteinů způsobí narušení produkce energie, které může vést ke kardiomyopatiím (Kwong et al., 2014). Další z fyziologických funkcí MPTP je podpora mitochondriálního $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku při výtoku Ca^{2+} . Je potvrzeno, že MPTP dokáže fungovat v rámci procesu vápníkem indukovaného vápníkového uvolnění (CICR), (Evtodienko et al., 1994).



Obrázek 4: Fyziologické a patofyziologické mechanismy otevření MPTP. Přechodné otevření MPTP je spojováno s ROS signalizací, vývojem kardiomyocytu a výtoku Ca^{2+} . ATP syntasom pak ovlivňuje svou činností metabolismus buňky. Dlouhodobé otevření MPTP vede naopak ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu, narušení produkce ATP, mitochondriálnímu bobtnání a buněčné smrti (převzato a upraveno z Kwong a Molkentin, 2014).

4.3 Otevření MPTP a jeho inhibice

MPTP se otevírá v prvních minutách reperfúze po delší ischemické periodě. V ischemické části zůstává zavřený (Griffiths a Halestrap, 1995). Jeho otevření spouští

především Ca^{2+} přetížení. To navíc může být podpořeno zvýšenou mírou oxidativního stresu, nebo koncentrací fosfátu, kdy je MPTP na Ca^{2+} citlivější (Crompton et al., 1988). V některých případech může být Ca^{2+} přetížení tak silné, že dokáže vyvolat otevření MPTP i v nepřítomnosti regulačního Cyp-D, či naopak v přítomnosti inhibitoru CsA (Baines et al., 2005). K inhibici otevření póru se využívá mechanismů ischemického conditioningu, či různých inhibitorů.

4.3.1 Ischemický conditioning

Snížení pravděpodobnosti otevření MPTP na začátku reperfúze působí kardioprotektivně. Jednou z metod, jak toho docílit je tzv. ischemický conditioning, kdy je srdce vystaveno mírným cyklům ischemie a reperfúze. Potvrzeny jsou pozitivní efekty především u ischemického preconditioningu a postconditioningu, které ovlivňují otevření póru snížením detrimentálních jevů vedoucích k jeho otevření, nebo aktivují mechanismy, které otevření brání.

Ischemický preconditioning využívá několik krátkých cyklů ischemie/reperfúze před delší ischemickou periodou. Díky tomu dochází k redukci velikosti postižené tkáně a zpomalení buněčné smrti. To potvrdila studie Murry et al. (1986), kdy došlo k aplikaci 5minutových cyklů ischemie/reperfúze u psů, následovaných 40minutovou ischemií. Velikost postižené tkáně pak byla menší o tři čtvrtiny oproti kontrolním vzorkům. Jedním z mechanismů, kterým preconditioning zmenšuje velikost postižené tkáně je inhibice tvorby MPTP. To bylo potvrzeno u králíků, kteří podstoupili jeden cyklus 5minutové ischemie a reperfúze následované 10minutovou ischemií. Díky tomu došlo ke zvýšení Ca^{2+} přetížení potřebného k otevření póru (Argaud et al., 2004).

Pokud dojde k aplikaci krátkých period ischemie během probíhající reperfúze, jedná se o tzv. postconditioning. Jeho protektivní efekt byl rovněž popsán na králíčím modelu, kdy byly provedeny 4 cykly minutové ischemie a reperfúze během 30 minut trvající ischemie a následné 4hodinové reperfúze. K otevření MPTP pak bylo potřeba signifikantně více Ca^{2+} než u kontrolních vzorků (Argaud et al., 2005). Podobný model byl aplikovaný i u myší, u kterých se navíc potvrdilo, že delece genu kódujícího Cyp-D má zásadní význam na tvorbu MPTP, a proto u nich postconditioning neměl žádný efekt (Lim et al., 2007).

4.3.1.1 Vliv conditioningu na tzv. pasivní a aktivní způsoby otevření MPTP

Ischemický conditioning může působit „pasivně“ a ovlivňovat mechanismy otevření MPTP související s produkcí ROS, či Ca^{2+} přetížením. Rovněž může působit „aktivně“ a přímo ovlivňovat některé signální dráhy, které vedou k otevření MPTP.

4.3.1.1.1 Pasivní inhibice otevření MPTP

Otevření MPTP závisí především na Ca^{2+} přetížení, depleci ATP a zvýšené produkci ROS. Nadbytek Ca^{2+} je považován za nejdůležitější faktor při aktivaci MPTP a mitochondriálního bobtnání. Během ischemie dojde k intracelulární acidóze, která vede k akumulaci Ca^{2+} v mitochondriích (Ruiz-Meana et al., 2006). Působením preconditioningu bylo dosaženo snížené akumulace Ca^{2+} a to pravděpodobně pomocí mitochondriálního K_{ATP} kanálu (mito K_{ATP}), (Murata et al., 2001). Některé studie, jako je např. Kim et al. (2006) hlavní roli Ca^{2+} zpochybnily a připisují ji spíše oxidativnímu stresu a normalizaci pH po reperfúzi. Účinek ROS produkovaných z obnovené činnosti elektron-transportního řetězce během reperfúze byl pozorován pomocí oxidace proteinového sensoru HSP-FRET (angl. heat shock protein 33 fluorescence resonance energy transfer), (Robin et al., 2007). Stejně jako Ca^{2+} přetížení i produkce ROS při reperfúzi může být potlačena ischemickým conditioningem (Clarke et al., 2008; Zhao et al., 2003).

4.3.1.1.2 Aktivní inhibice otevření MPTP

Při ischemickém conditioningu dochází ke spuštění specifických signálních drah (viz obrázek 5), které snižují pravděpodobnost tvorby MPTP. V následujících odstavcích budou zmíněny ty nejdůležitější z nich, pro správné pochopení problematiky aktivace/inhibice MPTP.

4.3.1.1.2.1 Působení HKII a GSK-3 β a jeho modulace signální drahou PI3K/Akt

Signální dráha PI3K/Akt svou funkcí udržuje metabolismus v buňkách, podporuje jejich proliferaci a chrání buňku před buněčnou smrtí. Při otevření MPTP jsou stěžejní navazující elementy PI3K/Akt dráha, HKII a GSK-3 β . Jak bylo zmíněno výše, HKII interaguje s VDAC a udržuje MPTP zavřený. Brání tak asociaci pro-apoptotického proteinu BAX s VDAC a uvolnění cytochromu c. Vedle toho také udržuje mitochondriální potenciál. Pokud dojde k disociaci HKII, dochází k mitochondriální depolarizaci

následované nekrózou buňky. To potvrdila inhibice HKII pomocí derivátu TAT-HKII a výsledné zvětšení I/R poškození (Smeele et al., 2011). Jedním z mechanismů, jak může odtržení HKII způsobit otevření MPTP, je vyšší produkce ROS. Závislost mezi činností HKII a snížením množství ROS potvrdil da Silva ve své studii (da Silva et al., 2004) na mozkových buňkách potkana.

Aktivitu HKII podporuje dráha PI3K/Akt. Pravděpodobně se tak děje dvěma způsoby. Fosforylace VDAC pomocí GSK-3 β zapříčiní odtržení HKII. Díky zvýšené aktivitě Akt může být tento mechanismus inhibován (Pastorino et al., 2005). Uvolnění HKII může být zabráněno i CsA pomocí inhibice peptidyl prolyl izomerázové aktivity CyP-D, jak bylo potvrzeno u nádorových buněk (Machida et al., 2006).

U kardiomyocytu se GSK-3 β nachází v cytosolu a během I/R se přemísť do mitochondrií, pravděpodobně působením ROS (Nishihara et al., 2007; Tanno et al., 2014). Při otevírání MPTP fosforyluje VDAC, a brání tak funkci HKII (Pastorino et al., 2005). Inaktivace GSK-3 β je zprostředkována její fosforylací pomocí Akt (Cross et al., 1995). To může způsobit snížení fosforylace VDAC, neodtržení HKII, a díky tomu menší pravděpodobnost otevření MPTP. Navíc se ukázalo, že aktivace signální dráhy PI3K/Akt/GSK-3 β před ischemií zvyšuje fosforylaci GSK-3 β , snižuje interakci mezi CyP-D a ANT v reperfúzi, a působí tak protektivně (Nishihara et al., 2007).

4.3.1.1.2.2 Mitochondriální K_{ATP} kanál

Jak bylo zmíněno výše mitoK_{ATP}, může působit kardioprotektivně snížením množství Ca²⁺ v matrix (Murata et al., 2001; Liu et al., 1998). Otevření kanálu by mohlo působit inhibičně na MPTP např. pomocí proteinkináz PKG a PKC- ϵ (Jabůrek et al., 2006). Ovšem nemusí tomu tak být vždy. Studie Sato et al. (2004) poukazuje na kardioprotektivní efekt modulovaný proteinkinázou A bez využití mitoK_{ATP}, ale zapojením jiného mitochondriálního kanálu mBK_{Ca} (mitochondriální Ca²⁺ senzitivní draslíkový kanál). Přesné mechanismy inhibice zatím nejsou známy.

inhibičně na tvorbu MPTP, avšak každý jiným mechanismem. CsA inhibuje vazbu Cyp-D na ANT a PiC (Griffiths a Halestrap, 1991). Oproti tomu Sangliferin A se váže na jiné místo a dochází ke zvýšení pravděpodobnosti vazby Cyp-D na proteiny MPTP. Efekt na konformační změny a peptidyl prolyl izomerázovou aktivitu je, stejně jako u CsA, inhibiční (Clarke et al., 2002). Vazba Cyp-D na proteiny mitochondriálních membrán může být zvýšena také thiokyanátem draselným (KSCN), (Connern a Halestrap, 1996), nebo fenylarsin oxidem (PAO), (McStay et al., 2002).

Terapie CsA prokazatelně zmenšuje poškození po infarktu myokardu, jak ukazuje klinická studie Piot et al. (2008) na vzorku 58 pacientů s akutní elevací ST segmentu. Při jednorázovém podání 2,5 mg/kg CsA před perkutánní koronární intervencí byl rozsah poškozené tkáně menší o 40 % oproti kontrolám. Zároveň se ukázal menší dopad na remodelaci tkáně levé komory u postižených srdcí (Mewton et al., 2010). Zcela novou perspektivu inhibice nabízí skořicové anilidy (acylové deriváty anilinu), které rovněž zabraňují tvorbě MPTP. Avšak mechanismus nezávisí na vazbě s Cyp-D (Fancelli et al., 2014).

5. Mitochondriální bobtnání

Mitochondriální bobtnání je způsobeno změnami iontové homeostáze mezi mitochondriální matrix a cytosolem. Působením vzniklého osmotického tlaku je směrem dovnitř mitochondrií hnána voda a dochází k postupnému zvětšování objemu mitochondrií. Zvětšení může být fyziologické a ovlivňovat funkci mitochondriálního metabolismu. Pokud přesáhne kapacitu regulačních mechanismů, dojde k remodelaci krist a IMM, praská OMM a aktivuje se apoptóza. Patologické bobtnání doprovází některá neurodegenerativní a kardiovaskulární onemocnění.

5.1 Mechanismus bobtnání a jeho důsledky

Při fyziologických podmínkách udržují mitochondrie v matrix stálý objem regulací vstupu a výstupu iontů (především Ca^{2+} a K^{+}) skrze IMM. Halestrap (Halestrap, 1986) objevil, že K^{+} dependentní Ca^{2+} vtok indukuje zvětšení objemu mitochondrií. Mitochondriální bobtnání je vyvoláno změnou v osmotickém tlaku, kvůli kterému dochází k transportu vody do matrix. Osmotický tlak přes IMM je ovládán změnami

v koncentracích iontů (Nowikowsky et al., 2009*). Je pravdou, že mírné zvětšení objemu může stimulovat mitochondriální funkci a metabolismus (Lim et al., 2002).

Vzhledem k velmi selektivní propustnosti IMM je bobtnání způsobeno hlavně vysokou koncentrací iontů v cytoplazmě, dysfunkcí transportu iontů a větší propustností IMM. Transport K^+ je ovládán několika kanály z nichž hlavní jsou mBK_{Ca} , $mitoK_{ATP}$ (vtok) a mitochondriální K^+/H^+ kanál (KHE), (výtok). Otevření mBK_{Ca} zvyšuje permeabilitu IMM pro K^+ a snižuje schopnost mitochondrií pohltit Ca^{2+} . Díky tomu mitochondrie předchází Ca^{2+} přetížení. Aktivací nečinného mK_{ATP} může dojít ke zvýšenému vtoku K^+ a tím ke zvětšení objemu. V některých případech se ukazuje, že takto zvýšený K^+ vtok může zlepšit respirační funkci mitochondrií (Aon et al., 2010).

Mitochondrie mohou fungovat také jako regulátor buněčné hladiny Ca^{2+} v buňce. Hlavními kanály, které zajišťují vtok Ca^{2+} do mitochondrií jsou MCU, které jsou závislé na mitochondriálním membránovém potenciálu a jejich aktivita je ovládána mitochondriálním Ca^{2+} uptake proteinem 1 (MICU1), (Pan et al., 2013). Malé zvýšení Ca^{2+} uvnitř mitochondrií způsobuje větší efektivitu elektron-transportního řetězce. Pokud přesáhne určitý práh dojde naopak k mitochondriálnímu bobtnání a otevření MPTP. Dalšími regulačními komponenty vtoku Ca^{2+} jsou mitochondriální ryanodinový receptor (mRyR) a rychlý mitochondriální vápníkový uptake (RaM), (Beutner et al., 2001). Hlavními regulátory výtoku iontů jsou Na^+/Ca^+ výměník (mNCX – regulován mj. mitochondriálním membránovým potenciálem), H^+/Ca^{2+} výměník (mHCX) a MPTP (Szabo a Zoratti, 2014). Pro udržení iontového gradientu je důležitý mitochondriální Na^+/H^+ výměník (mNHE), který reguluje aktivitu mNCX a zařizuje výtok Na^+ . Vedle těchto kanálů se v mitochondriích nachází i akvaporin 8 (AQP8), který je zodpovědný za vtok vody a za rychlé zvětšení objemu mitochondrií (Calamita et al., 2005).

Jedním ze způsobů, jak regulovat objem mitochondrií je otevírání MPTP. To může způsobit fluktuace mitochondriálního membránového potenciálu a rychlé uvolnění nahromaděného Ca^{2+} . Kritickou událostí mitochondriálního bobtnání je tzv. vysoce vodivé otevření MPTP. To vede k hydrolýze ATP a k obecně vysokému nahromadění Ca^{2+} . Objem matrix je tak vysoký, že dojde k ruptuře OMM a vypuštění pro-apoptotických proteinů, jako jsou cytochrom c, AIF a Smac/Diablo (Lu et al., 2011).

5.2 Mitochondriální bobtnání a způsoby měření

Mitochondriální bobtnání se nedá měřit *in vivo*. Výzkumné metody proto pracují s *in vitro* metodami na izolovaných mitochondriích. Základním způsobem, jak měřit mitochondriální bobtnání je spektrometrické sledování změny absorpce. Rozptyl světla, který je způsoben bobtnáním snižuje světelné transmisní spektrum. Mění tak refrakční koeficient, snižuje účinnost rozptylu a zvyšuje schopnost světelné transmise mitochondrií (Tedeschi a Harris, 1958). Ke změření objemu mitochondrií jsou používány také mikroskopické techniky (fluorescenční mikroskopie, elektronová mikroskopie), (Huang et al., 2009). Velmi přesnou metodou pro sledování vnitřní struktury mitochondrií a potenciálně i změny objemu je kryo-elektronová mikroskopie a tomografie, které dokážou sledovat stavbu multiproteinových komplexů, či samotných krist (Letts et al., 2016).

6. Cíle diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo porovnat působení mírného chladu (8 ± 1 °C) na srdce potkana po jednom, třech a deseti dnech expozice a následně po 5týdenní aklimaci s ohledem na roční období (léto/zima).

7. Materiál a metody

7.1 Laboratorní zvířata a jejich aklimace

K pokusu byli použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar (n= 6-8; hmotnosti uvedeny v příloze 2). Experiment zahrnoval celkem dvanáct skupin:

Letní chladová expozice/aklimace:

1. Potkani vystaveni pokojové teplotě 25 °C, kontrolní skupina pro akutní expozici (KA)
2. Potkani vystaveni jeden den akutní chladové expozici při teplotě 8±1 °C (1D)
3. Potkani vystaveni tři dny akutní chladové expozici při teplotě 8±1 °C (3D)
4. Potkani vystaveni deset dní akutní chladové expozici při teplotě 8±1 °C (10D)
5. Potkani vystaveni pokojové teplotě 25 °C, kontrolní skupina pro chronickou aklimaci (KCA)
6. Potkani vystaveni pět týdnů postupné chronické chladové aklimaci při teplotě 8±1 °C (CA)

Zimní chladová expozice/aklimace:

7. Potkani vystaveni pokojové teplotě 25 °C, kontrolní skupina pro akutní expozici (KA)
8. Potkani vystaveni jeden den akutní chladové expozici při teplotě 8±1 °C (1D)
9. Potkani vystaveni tři dny akutní chladové expozici při teplotě 8±1 °C (3D)
10. Potkani vystaveni deset dní akutní chladové expozici při teplotě 8±1 °C (10D)
11. Potkani vystaveni pokojové teplotě 25 °C, kontrolní skupina pro chronickou aklimaci (KCA)
12. Potkani vystaveni pět týdnů postupné chronické chladové aklimaci při teplotě 8±1 °C (CA)

7.2. Odběr tkáně a její zpracování

Po příslušné expozici/aklimaci byl zvířatům v hluboké anestezii (roztok thiopentalu 6 mg/100 g hmotnosti, intraperitoneálně) odebrán myokard. Zvíře bylo otevřeno přes oblast hrudníku a vyjmuté srdce bylo okamžitě rozděleno na levou komoru, pravou komoru a septum. Levá komora byla vložena do izolačního roztoku (viz příloha 1) uloženého na ledu. Ostatní části byly zamrazeny v tekutém dusíku pro další analýzu.

7.3 Izolace mitochondrií

Mitochondriální izolace byla provedena z levé srdeční komory potkana. Po odběru byla tkáň skladována na ledu v 5 ml izolačního pufru (viz příloha 1) a zvážena. Následně byla tkáň umístěna na vychlazený bloček potažený parafilmem a nastříhána na velmi malé kousky. Nastříhaná tkáň byla přesunuta zpět do izolačního roztoku a objem byl doplněn tak, aby vznikl 10% homogenát. Homogenizace tkáně proběhla ve skleněném homogenizátoru pomocí teflonového pístu. Ta vyžadovala zvýšenou opatrnost a každá homogenizace proběhla šesti pomalými tahy skleněného homogenizátoru nahoru a dolů oproti pístu. Teflonový píst byl připevněn k homogenizátoru (MLW MR25) a v průběhu homogenizace rotoval 700 ot/min. Takto připravený homogenát byl následně umístěn do centrifugačních zkumavek a centrifugován (centrifuga Hettich Universal 32 R) při 600 g po dobu 10 minut, při $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Po uplynutí centrifugace byl supernatant slit přes sítko do nových centrifugačních zkumavek a následně centrifugován při 8000 g po dobu 10 minut, při $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Vzniklý sediment představovaly izolované mitochondrie, které byly resuspendovány v 500 μl swelling pufru (viz příloha 1), uchovány na ledu a použity pro následné měření mitochondriálního bobtnání.

7.4 Mitochondriální bobtnání

Princip mitochondriálního bobtnání je založen na poklesu absorbance ($\lambda=520\text{ nm}$). Pokus byl prováděn na spektrofotometru Shimadzu UV-2600. Do kyvety byly postupně přidány roztoky swelling pufru (cca 900 μl podle množství izolovaných mitochondrií), 10 μl H_3PO_4 (100 mM) a 5 μl $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ (5 mM). (viz příloha 1). Po promíchání roztoků a nastavení nulové hodnoty absorbance bylo přidáno takové množství izolovaných mitochondrií, aby hodnota absorbance byla mezi 0,9 a 1,1 (cca 50 μl

izolovaných mitochondrií). Celkový objem kyvety byl 1 ml. Po minutové inkubaci bylo přidáno 20 μ l roztoku CaCl_2 . Na každý pokus byly postupně použity různé koncentrace CaCl_2 (5, 10, 20 a 30 μM). Výsledná koncentrace CaCl_2 v kyvetě byla 100, 200, 400 a 600 μM . Mitochondriální bobtnání bylo sledováno jako změna absorbance za 1 sekundu po dobu 5 minut.

7.5 Statistické vyhodnocení dat

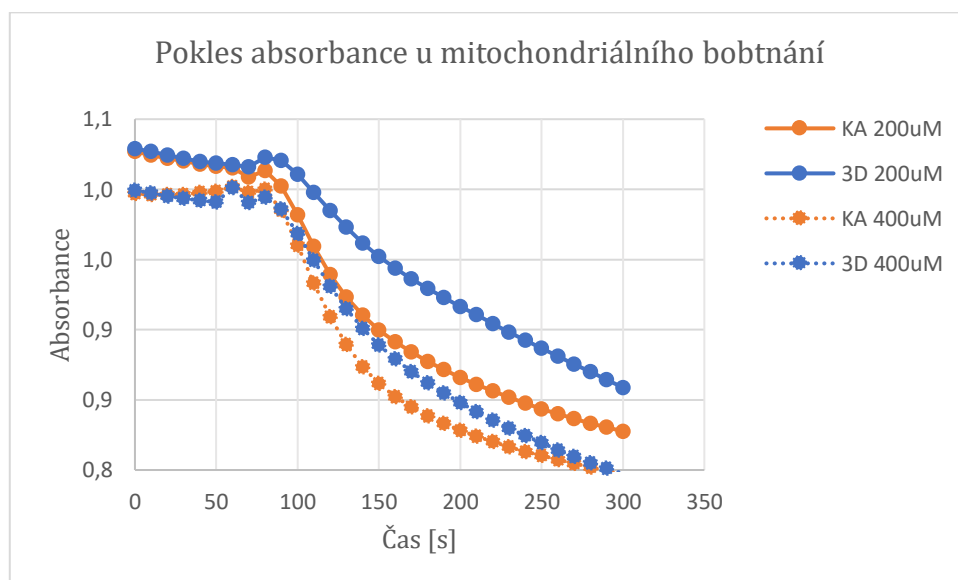
Naměřené hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel. Ze získaných hodnot absorbance byla určena nejvyšší hodnota po přidání CaCl_2 . Ta byla použita jako základ pro druhou derivaci. Pomocí této funkce jsme poté od nejvyšší hodnoty odečetli tu následující. Takto jsme postupovali až do konce měření. Díky tomu jsme získali křivku změny absorbance za jednu sekundu. Křivku jsme proložili křivkou váženého průměru a získali nejvyšší hodnotu změny absorbance. Ke statistickému vyhodnocení byl použit program GraphPad Prism 8, metody One-way ANOVA multiple comparisons test, Two-way ANOVA multiple comparisons test a nepárový t-test. Hladina významnosti $p < 0,05$, $n=6-8$.

8. Výsledky

Mitochondriální bobtnání poukazuje na odolnost mitochondrií proti Ca^{2+} přetížení, která je vyjádřena jako změna absorbance $\lambda=520 \text{ nm}$ ($\Delta A_{520} \cdot \text{s}^{-1}$). Následující grafy porovnávají vliv akutní chladové expozice (1D, 3D, 10D) a chronické aklimace (pět týdnů) a také vliv sezóny na tyto expozice/aklimace.

1) Pokles absorbance u mitochondriálního bobtnání

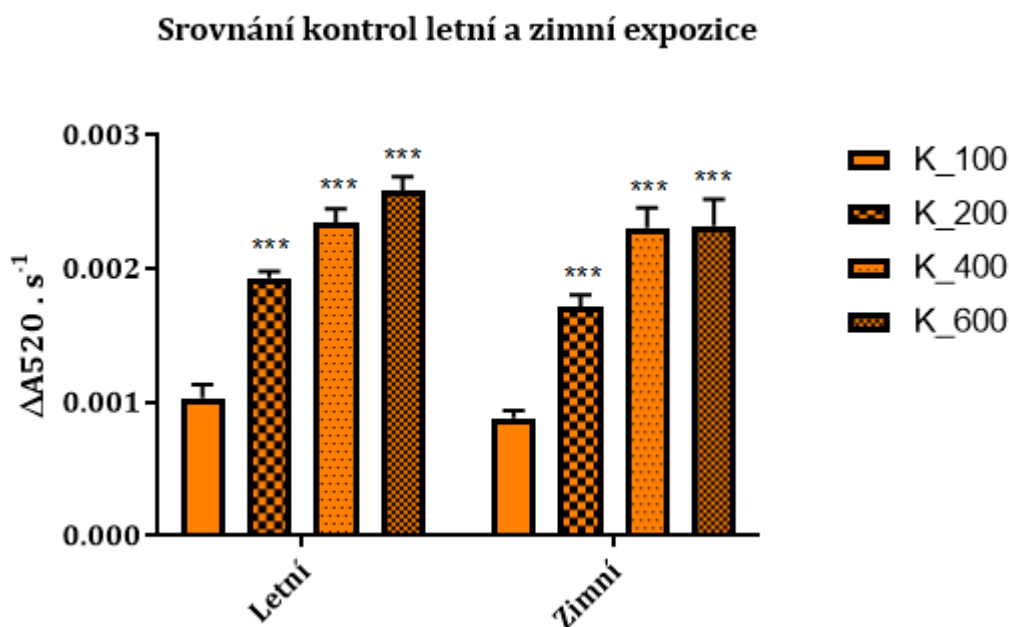
Znázornění poklesu absorbance mitochondriálního bobtnání u kontrolních vzorků (KA) a 3denní chladové expozice (3D) při dvou různých koncentracích CaCl_2 . Na začátku měření je hodnota absorbance ± 1 . V 60 sekundě byl podán roztok CaCl_2 a měření pokračovalo další 4 minuty. Z grafu je patrný pozvolnější pokles absorbance u skupiny 3D potkanů oproti kontrolní skupině. Pozvolnější pokles absorbance ukazuje na lepší odolnost mitochondrií. Z takto vytvořených grafů byly posléze získány hodnoty pro závěrečná vyhodnocení ve všech koncentracích.



Graf 1: Znázornění poklesu absorbance u mitochondriálního bobtnání u 3D chladové expozice při použití 200 a 400 μM koncentrace CaCl_2 . Osa x představuje bezrozměrnou veličinu absorbance. Osa y představuje čas uvedený v sekundách.

2) Porovnání kontrolních hodnot mezi letním a zimním modelem

U spojených kontrolních vzorků nedochází vlivem sezóny k žádným signifikantním rozdílům napříč jednotlivými koncentracemi. V grafu jsou obsaženy letní akutní a chronické kontroly a zimní akutní a chronické kontroly. Signifikantní rozdíly vzhledem k nejnižší koncentraci v rámci jedné sezóny pozorujeme u 200, 400 i 600 μM koncentrace v obou sezónách.

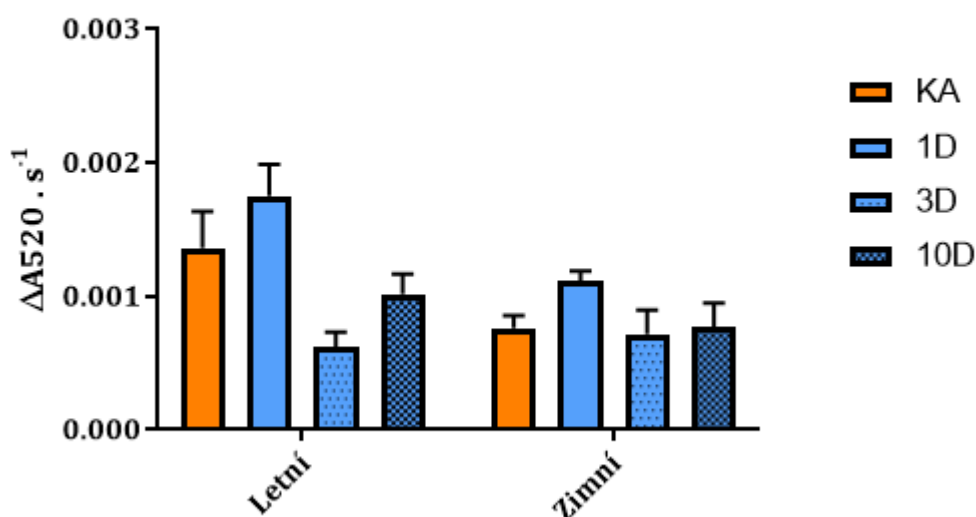


*Graf 2: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 100, 200, 400 a 600 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních zvířat vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny ONE WAY ANOVA vzhledem k nejnižší koncentraci v rámci sezóny, *** $p < 0,001$. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi jednotlivými koncentracemi, napříč sezónami. Chybové úsečky představují $\pm\text{SEM}$; letní: $n=10$; zimní: $n=10$*

3) Vliv akutní chladové expozice při 100 μM koncentraci CaCl_2 . Srovnání mezi letním a zimním modelem

Při 100 μM koncentraci CaCl_2 nedošlo u letního ani zimního modelu k signifikantním změnám. U letního modelu je patrný začínající klesající trend u 3D a 10D expozice. Zimní expozice jsou oproti kontrole neměnné. Zároveň nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými expozicemi v rámci sezóny.

Letní a zimní akutní expozice při 100 μM koncentraci CaCl_2

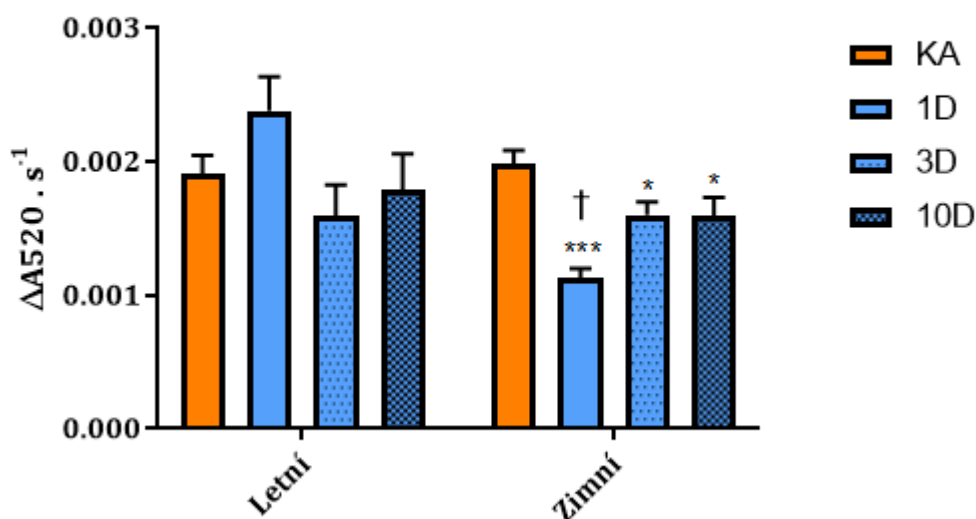


Graf 3: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 100 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních potkanů (KA) a potkanů vystavených 1denní (1D), 3denní (3D) a 10denní (10D) chladové expozici, vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny ONE WAY ANOVA vzhledem k odpovídající kontrole v rámci sezóny. Jednotlivé kontroly a expozice byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi sebou napříč sezónami. Chybové úsečky představují $\pm\text{SEM}$; letní: $n=6-8$; zimní: $n=6-8$.

4) Vliv akutní chladové expozice při 200 μM koncentraci CaCl_2 . Srovnání mezi letním a zimním modelem

Při 200 μM koncentraci CaCl_2 nedošlo u letního modelu k signifikantní změně absorbance u 3D a 10D expozice oproti kontrolní skupině. U zimního modelu došlo k signifikantnímu snížení změny absorbance u 1D expozice o 43 %, u 3D a 10D expozice o 19 % oproti kontrolní skupině. Mezi sezónami došlo k signifikantnímu snížení absorbance u 1D expozice o 49 %.

Letní a zimní akutní expozice při 200 μM koncentraci CaCl_2

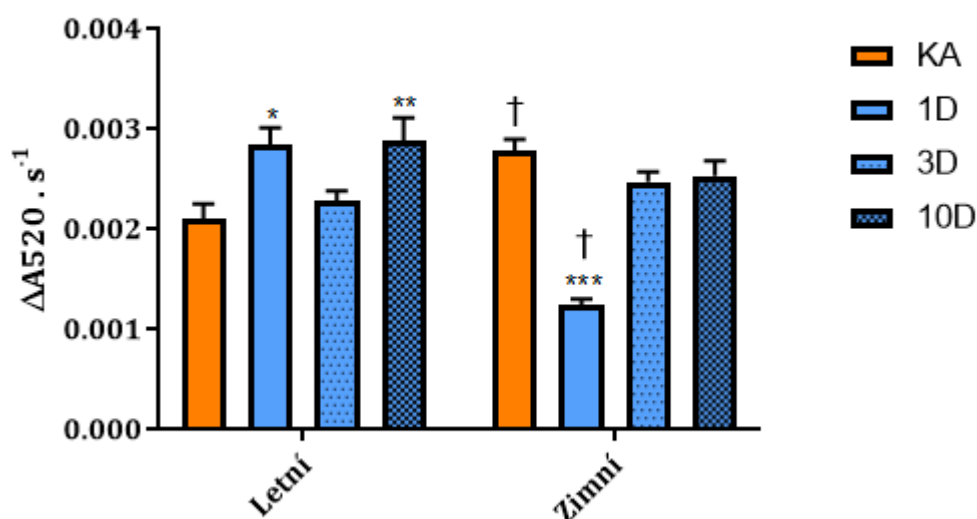


Graf 4: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 200 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních potkanů (KA) a potkanů vystavených 1denní (1D), 3denní (3D) a 10denní (10D) chladové expozici vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny ONE WAY ANOVA vzhledem k odpovídající kontrole v rámci sezóny * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Jednotlivé kontroly a expozice byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi sebou napříč sezónami † $p < 0,05$. Chybové úsečky představují $\pm\text{SEM}$; letní: $n=6-8$; zimní: $n=6-8$.

5) Vliv akutní chladové expozice při 400 μM koncentraci CaCl_2 . Srovnání mezi letním a zimním modelem

Při 400 μM koncentraci CaCl_2 došlo u letního modelu k signifikantnímu nárůstu změny absorbance u 1D expozice o 35 % a 10D expozice o 37 % oproti kontrolní skupině. U zimního modelu došlo k signifikantnímu snížení změny absorbance u 1D expozice o 65 % oproti kontrolní skupině. Mezi sezónami došlo k signifikantnímu nárůstu u zimní kontrolní skupiny o 32 % a k signifikantnímu snížení o 56 % u zimní 1D expozice.

Letní a zimní akutní expozice při 400 μM koncentraci CaCl_2

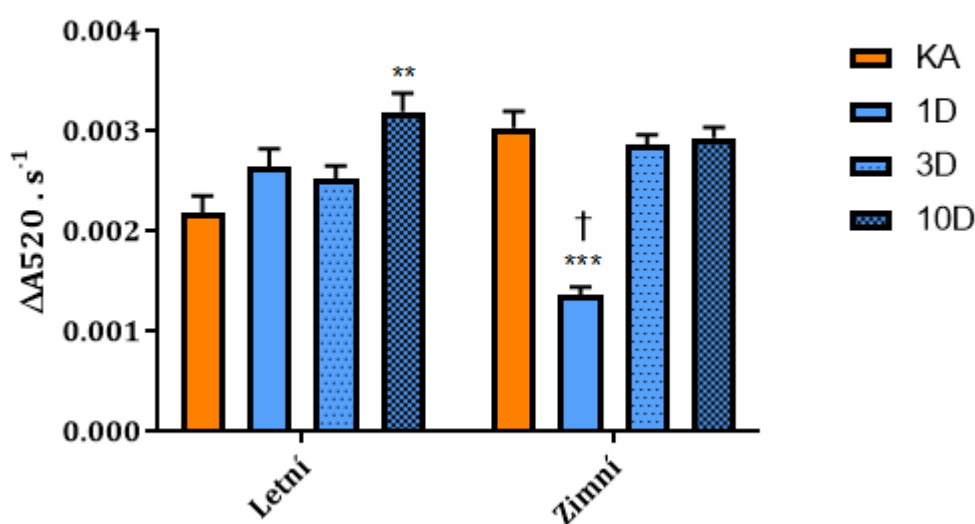


Graf 5: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 400 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních potkanů (KA) a potkanů vystavených 1denní (1D), 3denní (3D) a 10denní (10D) chladové expozici vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny ONE WAY ANOVA vzhledem k odpovídající kontrole v rámci sezóny * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Jednotlivé kontroly a expozice byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi sebou napříč sezónami † $p < 0,05$. Chybové úsečky představují $\pm\text{SEM}$; letní: $n=6-8$; zimní: $n=6-8$.

6) Vliv akutní chladové expozice při 600 μM koncentraci CaCl_2 . Srovnání mezi letním a zimním modelem

Při 600 μM koncentraci CaCl_2 došlo u letního modelu k signifikantnímu nárůstu změny absorbance u 10D expozice o 47 % oproti kontrolní skupině. U zimního modelu došlo k signifikantnímu snížení změny absorbance u 1D expozice o 65 % oproti kontrolní skupině. Mezi sezónami došlo k signifikantní změně u 1D expozice o 49 %.

Letní a zimní akutní expozice při 600 μM koncentraci CaCl_2

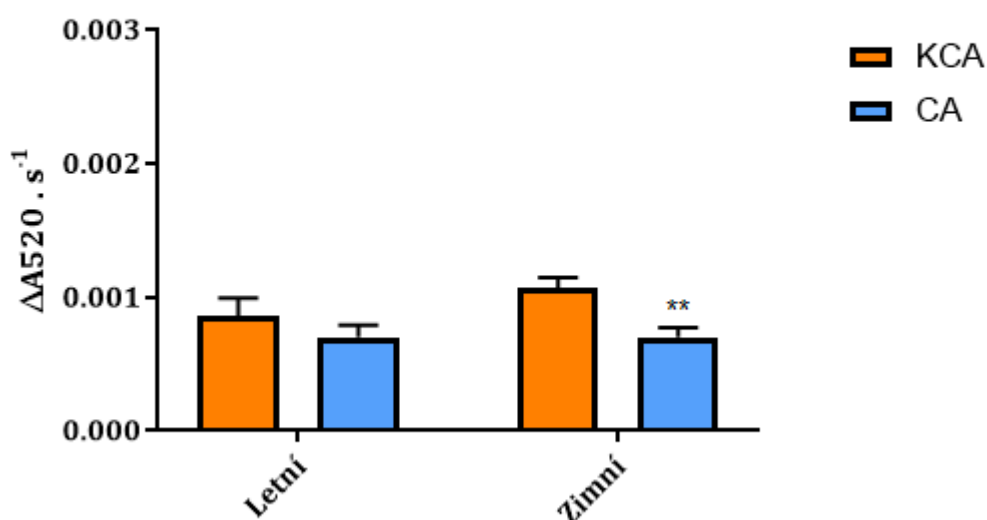


Graf 6: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 600 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních potkanů (KA) a potkanů vystavených 1denní (1D), 3denní (3D) a 10denní (10D) chladové expozici vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny ONE WAY ANOVA vzhledem k odpovídající kontrole v rámci sezóny ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Jednotlivé kontroly a expozice byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi sebou napříč sezónami † $p < 0,05$. Chybové úsečky představují $\pm\text{SEM}$; letní: $n=6-8$; zimní: $n=6-8$.

7) Vliv chronické chladové aklimace při 100 μM koncentraci CaCl_2 . Srovnání mezi letním a zimním modelem

Při 100 μM koncentraci CaCl_2 nedošlo u letní aklimace k signifikantní změně absorbance. U zimní aklimace bylo zaznamenáno signifikantní snížení o 35 % oproti kontrolní skupině. Porovnání mezi letním a zimním modelem nepřineslo signifikantní výsledek.

Letní a zimní chronická aklimace při 100 μM koncentraci CaCl_2

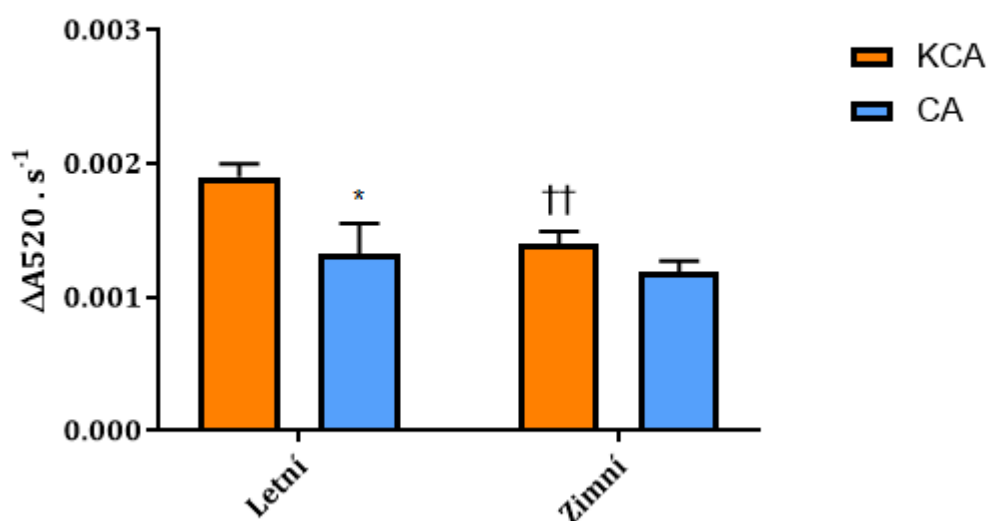


*Graf 7: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 100 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních potkanů (KCA) a potkanů vystavených chronické (5týdenní) aklimaci (CA), vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny t-testem vzhledem k odpovídající kontrole v rámci sezóny **p < 0,01. Jednotlivé kontroly a aklimace byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi sebou napříč sezónami. Chybové úsečky představují $\pm\text{SEM}$; letní: n=6-8; zimní: n=6.*

8) Vliv chronické chladové aklimace při 200 μM koncentraci CaCl_2 . Srovnání mezi letním a zimním modelem

Při 200 μM koncentraci CaCl_2 došlo u letní aklimace k signifikantnímu snížení změny absorbance o 31 % oproti kontrolní skupině. U zimní aklimace nebyla zaznamenána signifikantní změna. Porovnání mezi letním a zimním modelem byl zaznamenán signifikantní pokles o 27 % oproti letní kontrolní skupině.

Letní a zimní chronická aklimace při 200 μM koncentraci CaCl_2

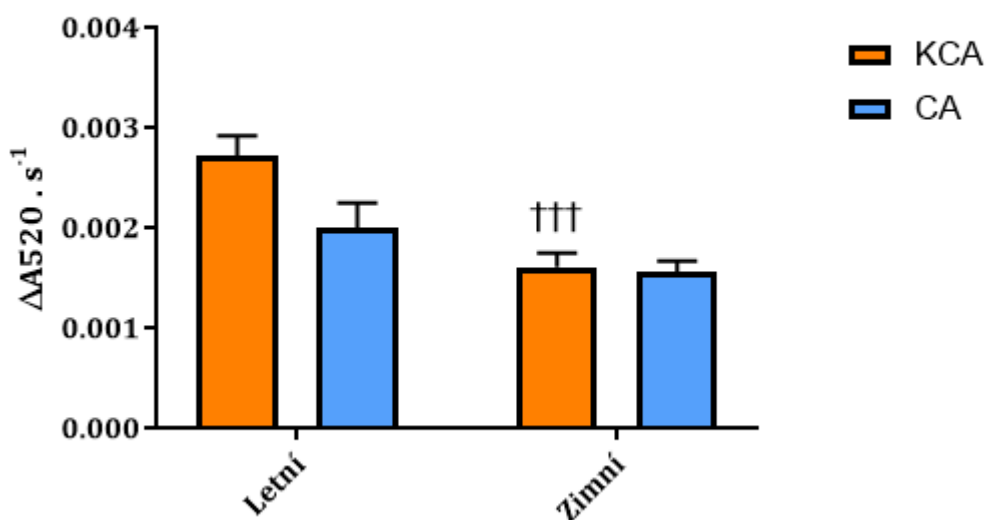


*Graf 8: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 200 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních potkanů (KCA) a potkanů vystavených chronické (5týdenní) aklimaci (CA), vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny t-testem vzhledem k odpovídající kontrole v rámci sezóny * $p < 0,05$. Jednotlivé kontroly a aklimace byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi sebou napříč sezónami †† $p < 0,01$. Chybové úsečky představují $\pm\text{SEM}$; letní: $n=6-8$; zimní: $n=6$*

9) Vliv chronické chladové aklimace při 400 μM koncentraci CaCl_2 . Srovnání mezi letním a zimním modelem

Při 400 μM koncentraci CaCl_2 nedošlo u letní ani u zimní aklimace k signifikantnímu snížení změny absorbance. Porovnání mezi zimním a letním modelem byl zaznamenán signifikantní pokles o 40 % oproti letní kontrolní skupině.

Letní a zimní chronická aklimace při 400 μM koncentraci CaCl_2

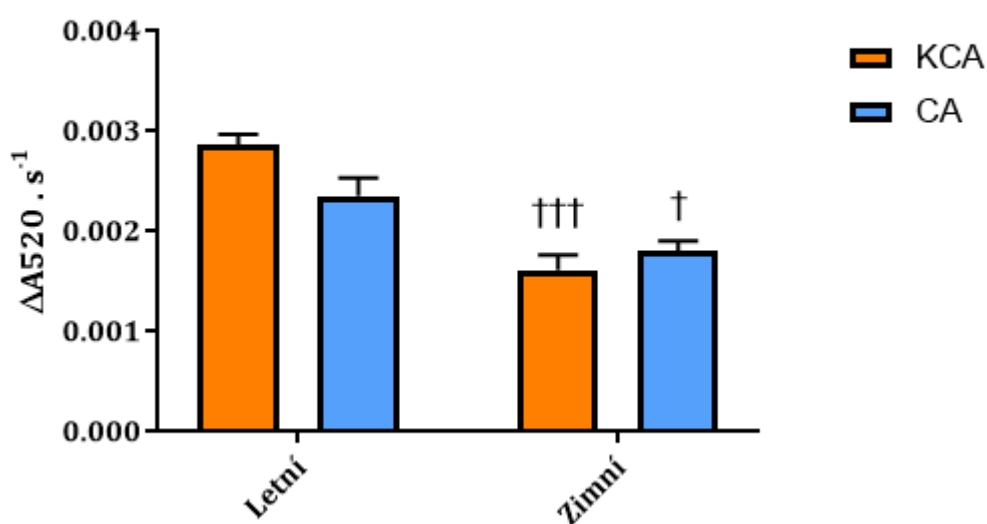


Graf 9: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 400 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních potkanů (KCA) a potkanů vystavených chronické (5týdenní) aklimaci (CA), vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny *t*-testem vzhledem k odpovídající kontrole v rámci sezóny. Jednotlivé aklimace byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi sebou napříč sezónami †††*p* <0,001. Chybové úsečky představují ±SEM; letní: *n*=6-8; zimní: *n*=6.

10) Vliv chronické chladové aklimace při 600 μM koncentraci CaCl_2 . Srovnání mezi letním a zimním modelem

Při 600 μM koncentraci CaCl_2 nedošlo u letní ani u zimní aklimace k signifikantnímu snížení změny absorbance. Porovnání mezi letním a zimním modelem byl zaznamenán signifikantní pokles o 46 % oproti letní kontrolní skupině a signifikantní pokles o 23 % u zimní aklimace.

Letní a zimní chronická aklimace při 600 μM koncentraci CaCl_2



Graf 10: Mitochondriální bobtnání v izolovaných mitochondriích levé komory srdce potkana při 600 μM koncentraci CaCl_2 u kontrolních potkanů (KCA) a potkanů vystavených chronické (5týdenní) aklimaci (CA), vyjádřeno jako změna absorbance za jednu sekundu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny t-testem vzhledem k odpovídající kontrole v rámci sezóny. Jednotlivé kontroly a aklimace byly statisticky vyhodnoceny TWO WAY ANOVA mezi sebou napříč sezónami $^{\dagger}p < 0,01$; $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0,001$. Chybové úsečky představují $\pm SEM$; letní: $n=6-8$; zimní: $n=6$.

9. Diskuse

Extrémní výkyvy teplot bývají často spojovány se zvýšenou pravděpodobností úmrtí na kardiovaskulární onemocnění. V létě dochází k horkým vlnám, které významně zvyšují počty úmrtí spojených s těmito komplikacemi (García-Herrera et al., 2010; Huynen et al., 2001). Zároveň byly zaznamenány i rozdíly ve vlivu horkých vln na pohlaví, či věk v souvislosti s rizikem úmrtí na ischemické poruchy srdce. Ženy a starší lidé (65+) jsou podle výzkumu náchylnější k potížím spojených s těmito podmínkami (Rey et al., 2007). Podobné statistické údaje jsou uváděny i v zimních měsících (The Eurowinter Group et al., 1997; Sheth et al., 1999), avšak úmrtí jsou zaznamenána v delší periodě a výsledky mohou být zkresleny vlivem zvýšeného výskytu sezónních onemocnění. Nedávné výsledky naší laboratoře ukázaly, že dlouhodobá expozice mírnému chladu snižuje velikost infarktu, která je doprovázená zvýšenou odolností mitochondrií (Tibenská et al. 2020). Zajímavý pohled přinesla studie, která popisuje vliv změn geomagnetického pole na incidenci infarktu myokardu u vzorku 435 mužů a 268 žen. Výzkum ukazuje na zvýšení incidence infarktu v souvislosti se zvýšenou silou geomagnetického pole, ke které dochází v období mezi květnem a říjnem (Jaruševičius et al., 2018).

Cílem předkládané diplomové práce bylo sledovat míru odolnosti mitochondrií izolovaných z levé komory myokardu potkana k přetížení Ca^{2+} , které doprovází protektivní efekt chladové aklimace (Tibenská et al. 2020). Současně s tím jsme sledovali, jakou úlohu má letní a zimní sezóna v tomto fenoménu.

Ve srovnání letních a zimních kontrolních vzorků nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl v mitochondriálním bobtnání, avšak bylo pozorováno zvýšené bobtnání mitochondrií s rostoucí koncentrací CaCl_2 v jednotlivých modelech. Tento nález je v souladu s předchozí prací Drahoty (Drahota et al., 2012a). Je důležité zmínit, že přidání koncentrace CaCl_2 je tkáňově specifické. U myokardu zaznamenáváme odpověď většinou mezi 100 a 200 μM koncentrací. U jater byla naměřena třikrát větší odpověď mitochondriálního bobtnání než u srdce při stejné koncentraci (Endlicher et al., 2009). Naopak pro změření mitochondriálního bobtnání u BAT je nutné použít vysoké koncentrace CaCl_2 1000-1200 μM (experimentálně potvrzeno).

Rozdíly v odpovědi mezi letní a zimní sezónou byly zaznamenány až u chladově exponovaných zvířat. Nicméně výsledky nejsou zcela jednoznačné. 3denní a 10denní

expozice v obou případech vykazují podobné hodnoty v létě i zimě. Avšak u letního modelu je změna mitochondriálního bobtnání mezi kontrolními a chladově exponovanými zvířaty minimální. Od použité 200 μM koncentrace CaCl_2 dochází k postupnému vyrovnávání hodnot mitochondriálního bobtnání s kontrolními skupinami. Překvapivé výsledky byly dosaženy při měření mitochondriálního bobtnání u 1denní chladové expozice. V zimním modelu došlo k signifikantnímu snížení mitochondriálního bobtnání u koncentrací 200, 400 a 600 μM . Naproti tomu u letního modelu není u mitochondriálního bobtnání zaznamenána změna, pouze tendence nárůstu absorbance. To může být způsobeno velkým teplotním šokem, na který není tělo potkana v letních měsících připraveno (Heldmaier et al., 1989), což mohou potvrdit i výsledky 3denní a 10denní expozice letního modelu, které se od zimního modelu tolik neliší. Zároveň je prokázáno, že v zimě je zvýšena kapacita netřesové termogeneze a liší se i exprese UCP proteinů (McElroy et al., 1986; Nizielski et al., 1995). Díky tomu by se mohla zvířata snadněji přizpůsobit teplotním změnám v zimních měsících.

U chronické aklimace bylo zaznamenáno snížení mitochondriálního bobtnání u letního i zimního modelu. Zvýšení odolnosti mitochondrií je zřejmé především v nižších koncentracích CaCl_2 (100, 200 μM). S rostoucí koncentrací CaCl_2 se měřená změna absorbance neliší od hodnot kontrolní skupiny. Mezi letním a zimním modelem nebyly zaznamenány téměř žádné rozdíly. Avšak při použití vysoké 600 μM koncentrace CaCl_2 došlo k signifikantnímu poklesu u zimní 5týdenní aklimace oproti letní. Navíc jsme pozorovali významně vyšší rozdíly mezi letním a zimním modelem jak u kontrolních skupin, tak i chladově aklimovaných skupin u 200–600 μM koncentrace CaCl_2 . Proto můžeme předpokládat, že mitochondrie ze zimního modelu jsou odolnější k mitochondriálnímu bobtnání. Pro naprostou přesnost pokusu by bylo potřeba zopakovat měření nejméně tři roky po sobě, aby se snížil vliv jiných faktorů, které naruší průběh pokusu a nemůžeme je ovlivnit (např. předchozí osvětlení zvířat, mírné kolísání teploty v chovném zařízení, vliv hluku jako stresoru atd.).

Je doloženo, že chlad v mnohých případech působí na kardiovaskulární systém detrimentálně. Je hlavním faktorem spojeným s vyšším počtem úmrtí na kardiovaskulární onemocnění v zimních měsících (Sheth et al., 1999; McGregor, Watkin a Cox, 2004). Dlouhodobé vystavení extrémnímu chladu (0-5 °C) vede ke zvýšení krevního tlaku, či hypertrofii srdce vlivem zvýšené produkce NA a souvisí např. se zvýšenou expresí c-Myc (Fregly et al., 1989; Bello Roufai, Li a Sun, 2007). Podobné

výsledky potvrdilo i několik modelových pokusů chronické aklimace. Tsibulnikov ve své studii (Tsibulnikov et al., 2019) potvrdil, že při kontinuální 4týdenní aklimaci (4 °C) dojde u potkanů ke zvýšení krevního tlaku, hmotnosti srdce a ledvin. Zajímavé je, že u modelu kontinuální aklimace došlo k signifikantnímu snížení (o 33 %) rozsahu postižené tkáně po poranění při infarktu myokardu. Podobných vlivů na srdce bez prokázané kardioprotekce bylo dosaženo již dříve při 20denní aklimaci (5 °C), či při 39denní aklimaci (5 °C), (Adolph, 1956; Shechtman et al., 1990). Ovšem ukazuje se, že může záležet na typu expozice. Mírnější, nebo postupné ochlazování ukazuje modely chladové aklimace, které disponují kardioprotektivními účinky bez zjevných vedlejších účinků. Ve studii Tibenské (Tibenská et al., 2020) nebylo zaznamenáno zvýšení krevního tlaku ani hypertrofie levé komory. Po chladové aklimaci při ± 8 °C a časovém rozpětí 8 hodin/denně po dobu jednoho týdne, následované 4týdenní celodenní aklimací, bylo zaznamenáno menší poranění po infarktu myokardu. Současně s tím byl zaznamenán pokles v mitochondriálním bobtnání. Podobných výsledků pak bylo dosaženo i v předkládané práci.

Jak bylo zaznamenáno na našich modelech, mohou mít vnější faktory vliv na pravděpodobnost otevření MPTP a následné mitochondriální bobtnání. Další rozdíly v mitochondriálním bobtnání byly pozorovány u neonatálního myokardu, který disponuje větší odolností vůči Ca^{2+} přetížení (Milerová et al., 2009; Drahota et al., 2012b). Podobně je tomu i mezi pohlavími, kdy dochází při 200 μM koncentraci CaCl_2 k větší odolnosti mitochondrií samičího srdce (Milerová et al., 2015). Nicméně přiměřené zvětšení mitochondriálního objemu je v jistých podmínkách fyziologický mechanismus. Je potvrzeno, že mitochondrie mohou zvětšit svůj objem o 20 až 30 % bez porušení integrity vnější mitochondriální membrány (Das, Parker a Halestrap, 2003). Mírné zvětšení objemu mitochondriální matrix může působit stimulačně na energetický metabolismus a chránit buňku proti oxidativnímu poškození. To dokazuje Limova studie (Lim et al., 2002), kdy takového zvětšení mitochondriální matrix bylo dosaženo mírným přerušovaným (3-5 min) ischemickým preconditioningem.

Otevření MPTP úzce souvisí s I/R poškozením. Jak bylo zmíněno výše, snížení mitochondriálního bobtnání navozené chladovou aklimací může být podstatou kardioprotektivního mechanismu. Zvýšení odolnosti mitochondrií bylo popsáno i u jiných kardioprotektivních režimů, jako je adaptace na hypoxii (Neckář et al. 2017).

Avšak chlad nemusí působit protektivně pouze skrze chladovou expozici/aklimaci. Jiný, avšak také účinný, pohled přináší výzkumy zabývající řízenou hypotermií. Díky ní dochází ke snížení buněčného poškození, čehož se využívá přímo při operacích nebo postoperačně (Guluma et al., 2006). Účinky se potvrdily i na izolovaných kardiomyocytech potkana. Hypotermie snižuje poškození během ischemie, avšak preventivní účinky nebyly potvrzeny (Bes et al., 2001). U celých izolovaných srdcí se ukázalo, že hypotermie působí protektivně a zabraňuje produkci ROS (Gambert et al., 2004). Jedním z mechanismů, kterým hypotermie brání I/R poškození, je zpomalení apoptózy, která se objevuje po dlouhodobém otevření MPTP. To je zprostředkováno např. snížením exprese kaspázy-3 nebo snížením exprese anti-apoptických Bcl-2 proteinů a zvýšením pro-apoptických proteinů BAX (Yang et al., 2009).

Závěrem lze říct, že chladová expozice/aklimace může působit kardioprotektivně proti I/R poškození. Jedním z mechanismů je snížení mitochondriálního bobtnání a otevírání MPTP, které může souviset se spuštěním apoptotických drah. Zároveň záleží na tom, který model chladové expozice/aklimace je použit.

10. Závěr

Potkani byli vystaveni 1denní, 3denní a 10tidenní akutní chladové expozici a 5týdenní chronické chladové aklimaci (± 8 °C). Všechny modely byly rozděleny podle sezóny na letní a zimní. U všech skupin bylo změřeno mitochondriální bobtnání, podáním čtyř různých koncentrací CaCl_2 (100, 200, 400 a 600 μM), spektrometricky, pomocí změny absorbance za jednu sekundu. Statistickým vyhodnocením proti kontrolním vzorkům jsme zjistili, že v 1denním zimním modelu dochází k signifikantně nižšímu mitochondriálnímu bobtnání u koncentrací 200, 400 a 600 μM . U 3denní a 10denní chladové expozice došlo k signifikantnímu snížení změny absorbance u koncentrace 200 μM oproti kontrole. Zároveň bylo zaznamenáno signifikantně nižší mitochondriální bobtnání u 1denní zimní expozice oproti letnímu 1dennímu modelu. Statistické vyhodnocení jednotlivých letních expozic oproti kontrole nepřineslo signifikantní výsledky.

U chronické aklimace jsme zjistili signifikantní změnu u letního modelu (200 μM) i u zimního modelu (100 μM). Mezi oběma modely chronické aklimace nebyly zaznamenány signifikantní změny. Důležitým výsledkem je značné signifikantní snížení mitochondriálního bobtnání zimních kontrolních vzorků oproti letnímu modelu. To může hrát roli v interpretaci výsledků zimní chladové aklimace.

Získané výsledky přinesly nový pohled na vliv některých modelů mírné chladové expozice a aklimace na mitochondriální bobtnání u srdce potkana. Zároveň je z výsledků patrné kardioprotektivní působení mírného chladu. Pro zpřesnění výsledků vlivu sezóny u jednotlivých modelů je zapotřebí zopakovat pokus nejméně tři roky po sobě.

11. Seznam literatury

Adlam, V., Harrison, J., Porteous, C., James, A., Smith, R., Murphy, M. and Sammut, I. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*, 19, pp.1088–1095.

Adolph, E.F. (1955). General and Specific Characteristics of Physiological Adaptations. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 184(1), pp.18–28.

Alavian, K.N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.-A., Licznerski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., Porter, G.A. and Jonas, E.A. (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F₁F₀ ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), pp.10580–10585.

Aon, M.A., Cortassa, S., Wei, A.-C., Grunnet, M. and O'Rourke, B. (2010). Energetic performance is improved by specific activation of K⁺ fluxes through KCa channels in heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(1), pp.71–80.

Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Chalabreysse, L., Gomez, L., Loufouat, J., Thivolet-Bejui, F., Robert, D. and Ovize, M. (2004). Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular Research*, 61(1), pp.115–122.

Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Raitsky, O., Loufouat, J., Robert, D. and Ovize, M. (2005). Postconditioning Inhibits Mitochondrial Permeability Transition. *Circulation*, 111(2), pp.194–197.

Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J. and Molkentin, J.D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434(7033), pp.658–662.

Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J. and Molkentin, J.D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology*, 9(5), pp.550–555.

Banet, M., Hensel, H. and Liebermann, H. (1978). The central control of shivering and non-shivering thermogenesis in the rat. *The Journal of Physiology*, 283(1), pp.569–584.

*Barnett, S. (1965). Adaptation of mice to cold. *Biol. Rev*, 40(1), pp.5–51.

Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A. and Bernardi, P. (2005). Properties of the Permeability Transition Pore in Mitochondria Devoid of Cyclophilin D. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), pp.18558–18561.

*Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. and Brunner, M. (2000). Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends in Cell Biology*, 10(1), pp.25–31.

Bello Roufai, M., Li, H. and Sun, Z. (2007). Heart-specific inhibition of protooncogene c-myc attenuates cold-induced cardiac hypertrophy. *Gene Therapy*, 14, pp.1406–1416.

Bes, S., Roussel, P., Laubriet, A., Vandroux, D., Tissier, C., Rochette, L. and Athias, P. (2001). Influence of Deep Hypothermia on the Tolerance of the Isolated Cardiomyocyte to Ischemia–Reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(11), pp.1973–1988.

Beutner, G., Sharma, V.K., Giovannucci, D.R., Yule, D.I. and Sheu, S.-S. (2001). Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), pp.21482–21488.

Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G. and Schulz, R. (2010). Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Research in Cardiology*, 105(6), pp.771–785.

Bowles, D.K. and Starnes, J.W. (1994). Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *Journal of Applied Physiology*, 76(4), pp.1608–1614.

Braunwald, E. and Kloner, R. (1982). The Stunned Myocardium: Prolonged, Postischemic Ventricular Dysfunction. *Circulation*, 66(6), pp.1146–1149.

Brown, D.A., Chicco, A.J., Jew, K.N., Johnson, M.S., Lynch, J.M., Watson, P.A. and Moore, R.L. (2005). Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the K_{ATP} channel in the rat. *The Journal of Physiology*, 569(3), pp.913–924.

Calamita, G., Ferri, D., Gena, P., Liquori, G.E., Cavalier, A., Thomas, D. and Svelto, M. (2005). The Inner Mitochondrial Membrane Has Aquaporin-8 Water Channels and Is Highly Permeable to Water. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), pp.17149–17153.

*Cannon, B. and Nedergaard, J. (2010). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *Journal of Experimental Biology*, 214(2), pp.242–253.

Chandrasekar, B., Nelson, J.F., Colston, J.T. and Freeman, G.L. (2001). Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 280(5), pp.H2094–H2102.

Chen, Z., Siu, B., Ho, Y.-S., Vincent, R., Chua, C.C., Hamdy, R.C. and Chua, B.H.L. (1998). Overexpression of MnSOD Protects Against Myocardial Ischemia/reperfusion Injury in Transgenic Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(11), pp.2281–2289.

Chiara, F., Castellaro, D., Marin, O., Petronilli, V., Brusilow, W.S., Juhaszova, M., Sollott, S.J., Forte, M., Bernardi, P. and Rasola, A. (2008). Hexokinase II Detachment from Mitochondria Triggers Apoptosis through the Permeability Transition Pore Independent of Voltage-Dependent Anion Channels. *PLoS ONE*, 3(3), pp.1852.

Chinopoulos, C., Konr d, C., Kiss, G., Metelkin, E., T r csik, B., Zhang, S.F. and Starkov, A.A. (2011). Modulation of F0F1-ATP synthase activity by cyclophilin D regulates matrix adenine nucleotide levels. *FEBS Journal*, 278(7), pp.1112–1125.

Clarke, S.J., Khaliulin, I., Das, M., Parker, J.E., Heesom, K.J. and Halestrap, A.P. (2008). Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening by Ischemic Preconditioning Is Probably Mediated by Reduction of Oxidative Stress Rather Than Mitochondrial Protein Phosphorylation. *Circulation Research*, 102(9), pp.1082–1090.

Clarke, S.J., McStay, G.P. and Halestrap, A.P. (2002). Sanglifehrin A Acts as a Potent Inhibitor of the Mitochondrial Permeability Transition and Reperfusion Injury of the Heart by Binding to Cyclophilin-D at a Different Site from Cyclosporin A. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), pp.34793–34799.

Connern, C.P. and Halestrap, A.P. (1996). Chaotropic Agents and Increased Matrix Volume Enhance Binding of Mitochondrial Cyclophilin to the Inner Mitochondrial Membrane and Sensitize the Mitochondrial Permeability Transition to $[Ca^{2+}]$. *Biochemistry*, 35(25), pp.8172–8180.

Crompton, M., Ellinger, H. and Costi, A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J*, 255, pp.357–360.

Cross, D., Alessi, D., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(21), pp.785–789.

Das, M., Parker, J.E. and Halestrap, A.P. (2003). Matrix volume measurements challenge the existence of diazoxide/glibencamide-sensitive K_{ATP} channels in rat mitochondria. *The Journal of Physiology*, 547(3), pp.893–902.

De Chiara, G., Marcocci, M., Torcia, M., Lucibello, M., Rosini, P., Bonini, P., Higashimoto, Y., Damonte, G., Armirotti, A., Amodei, S., Palamara, A., Russo, T., Garaci, E. and Cozzolino, F. (2006). Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: Identification of Target Sites and Biologic Consequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(30), pp.21353–21361.

Demirel, H.A., Powers, S.K., Zergeroglu, M.A., Shanely, R.A., Hamilton, K., Coombes, J. and Naito, H. (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Journal of Applied Physiology*, 91(5), pp.2205–2212.

Drahota, Z., Endlicher, R., Staňková, P., Rychtrmoc, D., Milerová, M. and Červinková, Z. (2012a). Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(3), pp.309–315.

Drahota Z, Milerová M, Endlicher R, Rychtrmoc D, Červinková Z, Ošťádal B. Developmental changes of the sensitivity of cardiac and liver mitochondrial permeability transition pore to calcium load and oxidative stress. (2012b) *Physiol Res*, 61(1), pp.165-172

Elsässer, A., Schlepper, M., Klövekorn, W.-P., Cai, W., Zimmermann, R., Müller, K.-D., Strasser, R., Kostin, S., Gagel, C., Munkel, B., Schaper, W. and Schaper, J. (1997). Hibernating Myocardium: an Incomplete Adaptation to Ischemia. *Circulation*, 96(9), pp.2920–2931.

Endlicher, R., Křiváková, P., Lotková, H., Milerová, M., Drahota, Z. and Červinková, Z. (2009). Tissue Specific Sensitivity of Mitochondrial Permeability Transition Pore to Ca^{2+} Ions. *Acta Medica*, 52(2), pp.69–72.

The Eurowinter Group (1997). Cold exposure and winter mortality from ischaemic heart disease, cerebrovascular disease, respiratory disease, and all causes in warm and cold regions of Europe. *Lancet*, 349, pp.1341–1346.

Evtodienko, Y., Teplova, V., Khawaja, J. and Saft, N. (1994). The Ca^{2+} -induced permeability transition involved in Ca^{2+} -induced mitochondrial oscillations pore is A study on permeabilised Ehrlich ascites tumour cells. *Cell Calcium*, 15, pp.143–152.

Fan, M., Du, L., Stone, A., Gilbert, K. and Chambers, T. (2000). Modulation of Mitogen-activated Protein Kinases and Phosphorylation of Bcl-2 by Vinblastine Represent Persistent Forms of Normal Fluctuations at G2–M1. *Cancer Research*, 60, pp.6403–6407.

Fancelli, D., Abate, A., Amici, R., Bernardi, P., Ballarini, M., Cappa, A., Carenzi, G., Colombo, A., Contursi, C., Di Lisa, F., Dondio, G., Gagliardi, S., Milanese, E., Minucci, S., Pain, G., Pelicci, P.G., Sacconi, A., Storto, M., Thaler, F., Varasi, M., Villa, M. and Plyte, S. (2014). Cinnamic Anilides as New Mitochondrial Permeability Transition Pore Inhibitors Endowed with Ischemia-Reperfusion Injury Protective Effect in Vivo. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(12), pp.5333–5347.

Foster, D.O. and Frydman, M.L. (1978). Brown Adipose Tissue: The Dominant Site of Nonshivering Thermogenesis in the Rat. *Experientia Supplementum*, 32, pp.147–151.

Fregly, M.J., Kikta, D.C., Threatte, R.M., Torres, J.L. and Barney, C.C. (1989). Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *Journal of Applied Physiology*, 66(2), pp.741–749.

Gambert, S., Bès-Houtmann, S., Vandroux, D., Tissier, C., Vergely-Vandriesse, C., Rochette, L. and Athias, P. (2004). Deep hypothermia during ischemia improves functional recovery and reduces free-radical generation in isolated reperfused rat heart. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 23(4), pp.487–491.

García-Herrera, R., Díaz, J., Trigo, R.M., Luterbacher, J. and Fischer, E.M. (2010). A Review of the European Summer Heat Wave of 2003. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(4), pp.267–306.

Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G. and Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), pp.5887–5892.

Gottlieb, E., Armour, S.M., Harris, M.H. and Thompson, C.B. (2003). Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 10(6), pp.709–717.

Griffiths, E.J. and Halestrap, A.P. (1991). Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Implications for the immunosuppressive and toxic effects of cyclosporin. *Biochemical Journal*, 274(2), pp.611–614.

Griffiths, E.J. and Halestrap, A.P. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochemical Journal*, 307(1), pp.93–98.

Guluma, K.Z., Hemmen, T.M., Olsen, S.E., Rapp, K.S. and Lyden, P.D. (2006). A Trial of Therapeutic Hypothermia via Endovascular Approach in Awake Patients with Acute Ischemic Stroke: Methodology. *Academic Emergency Medicine*, 13(8), pp.820–827.

Halestrap, A.P., Quinlan, P.T., Whipps, D.E. and Armston, A.E. (1986). Regulation of the mitochondrial matrix volume in vivo and in vitro. The role of calcium. *Biochemical Journal*, 236(3), pp.779–787.

Halestrap, A.P. and Richardson, A.P. (2015). The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, pp.129–141.

Hamilton, K., Powers, S., Sugiura, T., Kim, S., Lennon, S., Tumer, N., Mehta, J. and Powers, S. (2001). Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, pp.1346–1352.

Hamilton, K.L., Quindry, J.C., French, J.P., Staib, J., Hughes, J., Mehta, J.L. and Powers, S.K. (2004). MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), pp.1360–1368.

Hart, J., Heroux, F. and Depocas, F. (1956). Cold Acclimation and the Electromyogram of Unanesthetized Rats. *Journal of Applied Physiology*, 9(3), pp.404–408.

*Hausenloy, D.J. and Yellon, D.M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), pp.92–100.

He, L. and Lemasters, J.J. (2002). Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Letters*, 512(1–3), pp.1–7.

Heldmaier, G., Steinlechner, S., Ruf, T., Wiesinger, H. and Klingenspor, M. (1989). Photoperiod and Thermoregulation in Vertebrates: Body Temperature Rhythms and Thermogenic Acclimation. *Journal of Biological Rhythms*, 4(2), pp.139–153.

Hernando, V., Inserte, J., Sartório, C.L., Parra, V.M., Poncelas-Nozal, M. and Garcia-Dorado, D. (2010). Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(2), pp.271–279.

Hsieh, A. and Carlson, L. (1957). Role of Adrenaline and Noradrenaline in Chemical Regulation of Heat Production. *American Journal of Physiology*, 190(2), pp.243–246

Huang, B., Bates, M. and Zhuang, X. (2009). Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), pp.993–1016.

Huynen, M.M., Martens, P., Schram, D., Weijenberg, M.P. and Kunst, A.E. (2001). The impact of heat waves and cold spells on mortality rates in the Dutch population. *Environmental Health Perspectives*, 109(5), pp.463–470.

Inagaki, K., Chen, L., Ikeno, F., Lee, F.H., Imahashi, K., Bouley, D.M., Rezaee, M., Yock, P.G., Murphy, E. and Mochly-Rosen, D. (2003). Inhibition of δ -Protein Kinase C Protects Against Reperfusion Injury of the Ischemic Heart In Vivo. *Circulation*, 108(19), pp.2304–2307.

Jabůrek, M., Costa, A.D.T., Burton, J.R., Costa, C.L. and Garlid, K.D. (2006). Mitochondrial PKC ϵ and Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channel Copurify and Coreconstitute to Form a Functioning Signaling Module in Proteoliposomes. *Circulation Research*, 99(8), pp.878–883.

Jacobsson, A., Muhleisen, M., Cannon, B. and Nedergaard, J. (1994). The uncoupling protein thermogenin during acclimation: indications for pretranslational control. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 267(4), pp.999–1007.

Jaruševičius, G., Rugelis, T., McCraty, R., Landauskas, M., Berškienė, K. and Vainoras, A. (2018). Correlation between Changes in Local Earth's Magnetic Field and Cases of Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(3), p.399.

Javadov, S., Choi, A., Rajapurohitam, V., Zeidan, A., Basnakian, A.G. and Karmazyn, M. (2007). NHE-1 inhibition-induced cardioprotection against ischaemia/reperfusion is associated with attenuation of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular Research*, 77(2), pp.416–424.

Jian, W., Dong, H., Zhu, W., Zhong Zhu, H., Lei Ding, M., Ma, Z., Zhou, N. and Zhao, N. (2003). Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Research*, 13(5), pp.385–391.

Kaiser, R.A., Liang, Q., Bueno, O., Huang, Y., Lackey, T., Klevitsky, R., Hewett, T.E. and Molkentin, J.D. (2005). Genetic Inhibition or Activation of JNK1/2 Protects the Myocardium from Ischemia-Reperfusion-induced Cell Death in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), pp.32602–32608.

*Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M. and Korthuis, R.J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology Volume 298*, 298, pp.229–317.

Kaludercic, N., Carpi, A., Menabò, R., Di Lisa, F. and Paolocci, N. (2011). Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(7), pp.1323–1332.

Kasparova, D., Neckar, J., Dabrowska, L., Novotny, J., Mraz, J., Kolar, F. and Zurmanova, J. (2015). Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiological Genomics*, 47(12), pp.612–620.

Kavazis, A.N., Alvarez, S., Talbert, E., Lee, Y. and Powers, S.K. (2009). Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(1), pp.144–152.

Kavazis, A.N., McClung, J.M., Hood, D.A. and Powers, S.K. (2008). Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(2), pp.928–935.

Kim, J.-S., Jin, Y. and Lemasters, J.J. (2006). Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(5), pp.2024–2034.

- Kim, S.-J., Peppas, A., Hong, S.-K., Yang, G., Huang, Y., Diaz, G., Sadoshima, J., Vatner, D.E. and Vatner, S.F. (2003). Persistent Stunning Induces Myocardial Hibernation and Protection. *Circulation Research*, 92(11), pp.1233–1239.
- Kiray, M., Bagriyanik, H., Pekcetin, C., Ugur Ergur, B. and Uysal, N. (2008). Protective Effects of Deprenyl in Transient Cerebral Ischemia in Rats. *Chinese Journal of Physiology*, 51(5), pp.275–281.
- Ko, Y.H., Delannoy, M., Hullihen, J., Chiu, W. and Pedersen, P.L. (2003). Mitochondrial ATP Synthasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), pp.12305–12309.
- Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R. and Wallace, D.C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 427(6973), pp.461–465.
- Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M.T., Meisinger, C., Kassenbrock, C.K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M.G., Neupert, W., Nargang, F.E. and Pfanner, N. (2001). Biogenesis of Porin of the Outer Mitochondrial Membrane Involves an Import Pathway via Receptors and the General Import Pore of the Tom Complex. *Journal of Cell Biology*, 152(2), pp.289–300.
- Kwong, J.Q., Davis, J., Baines, C.P., Sargent, M.A., Karch, J., Wang, X., Huang, T. and Molkentin, J.D. (2014). Genetic deletion of the mitochondrial phosphate carrier desensitizes the mitochondrial permeability transition pore and causes cardiomyopathy. *Cell Death & Differentiation*, 21(8), pp.1209–1217.
- Kwong, J.Q. and Molkentin, J.D. (2015). Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell Metabolism*, 21(2), pp.206–214.
- Lacerda, L., Somers, S., Opie, L.H. and Lecour, S. (2009). Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovascular Research*, 84(2), pp.201–208.
- LaNoue, K., Mizani, S. and Klingenberg, M. (1978). Electrical Imbalance of Adenine Nucleotide Transport across the Mitochondrial Membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(1), pp.191–198.
- Lee, Y., Min, K., Talbert, E.E., Kavazis, E.E., Kavazis, A.N., Smuder, A.J., Willis, W.T. and Powers, S.K. (2012). Exercise Protects Cardiac Mitochondria against Ischemia–Reperfusion Injury. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 44(3), pp.397–405.
- Leppäluoto, J., Lybeck, H., Ranta, T. and Virkkunen, P. (1973). Effect of Acute Exposure to Cold on Blood Thyrotrophin (TSH) and Corticosterone Concentrations in the Rabbit. *Acta Physiologica Scandinavica*, 89(3), pp.423–428.

- Letts, J.A., Fiedorczuk, K. and Sazanov, L.A. (2016). The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*, 537(7622), pp.644–648.
- Leung, A.W.C., Varanyuwatana, P. and Halestrap, A.P. (2008). The Mitochondrial Phosphate Carrier Interacts with Cyclophilin D and May Play a Key Role in the Permeability Transition. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), pp.26312–26323.
- Li, R., Ding, T., Liu, X. and Li, C. (2006). Influence of SB203580 on Cell Apoptosis and P38MAPK in Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 26(1), pp.50–52.
- Lim, K.H.H., Javadov, S.A., Das, M., Clarke, S.J., Suleiman, M.-S. and Halestrap, A.P. (2002). The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration. *The Journal of Physiology*, 545(3), pp.961–974.
- Lim, S., Davidson, D., Hausenloy, D. and Yellon, D. (2007). Preconditioning and postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research*, 75(3), pp.530–535.
- Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B. and Marban, E. (1998). Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels. *Circulation*, 97(24), pp.2463–2469.
- Lu, N., Sun, Y. and Zheng, X. (2011). Orientin-Induced Cardioprotection against Reperfusion Is Associated with Attenuation of Mitochondrial Permeability Transition. *Planta Medica*, 77(10), pp.984–991.
- Ma, H.-J., Li, Q., Ma, H.-J., Guan, Y., Shi, M., Yang, J., Li, D.-P. and Zhang, Y. (2014). Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia Ameliorates Ischemia/Reperfusion-Induced Calcium Overload in Heart via Na⁺/Ca²⁺Exchanger in Developing Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(2), pp.313–324.
- Machida, K., Ohta, Y. and Osada, H. (2006). Suppression of Apoptosis by Cyclophilin D via Stabilization of Hexokinase II Mitochondrial Binding in Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), pp.14314–14320.
- McElroy, J.F., Mason, P.W., Hamilton, J.M. and Wade, G.N. (1986). Effects of diet and photoperiod on NE turnover and GDP binding in Siberian hamster brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 250(3), pp.383–388.
- McGregor, G., Watkin, H. and Cox, M. (2004). Relationships between the seasonality of temperature and ischaemic heart disease mortality: implications for climate based health forecasting. *Climate Research*, 25, pp.253–263.

McStay, G.P., Clarke, S.J. and Halestrap, A.P. (2002). Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemical Journal*, 367(2), pp.541–548.

Melo, D.S., Costa-Pereira, L.V., Santos, C.S., Mendes, B.F., Costa, K.B., Santos, C.F.F., Rocha-Vieira, E., Magalhães, F.C., Esteves, E.A., Ferreira, A.J., Guatimosim, S. and Dias-Peixoto, M.F. (2016). Severe Calorie Restriction Reduces Cardiometabolic Risk Factors and Protects Rat Hearts from Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in Physiology*, 7, pp.1-8.

Mewton, N., Croisille, P., Gahide, G., Rioufol, G., Bonnefoy, E., Sanchez, I., Cung, T.T., Sportouch, C., Angoulvant, D., Finet, G., André-Fouët, X., Derumeaux, G., Piot, C., Vernhet, H., Revel, D. and Ovize, M. (2010). Effect of Cyclosporine on Left Ventricular Remodeling After Reperfused Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(12), pp.1200–1205.

Milerová, M., Drahota, Z., Chytilová, A., Tauchmannová, K., Houštěk, J. and Ošťádal, B. (2015). Sex difference in the sensitivity of cardiac mitochondrial permeability transition pore to calcium load. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 412(1–2), pp.147–154.

Milerova, M., Charvatova, Z., Skarka, L., Ostadalova, I., Drahota, Z., Fialova, M. and Ostadal, B. (2009). Neonatal cardiac mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 335(1–2), pp.147–153.

*Miura, T. and Tanno, M. (2011). The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. *Cardiovascular Research*, 94(2), pp.181–189.

Montero, M., Alonso, M., Albillos, A., García-Sancho, J. and Alvarez, J. (2001). Mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} Release Mediated by the Ca^{2+} Uniporter. *Molecular Biology of the Cell*, 12, pp.63–71.

Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B. and Marbán, E. (2001). Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels Attenuate Matrix Ca^{2+} Overload During Simulated Ischemia and Reperfusion. *Circulation Research*, 89(10), pp.891–898.

Murriel, C.L., Churchill, E., Inagaki, K., Szweda, L.I. and Mochly-Rosen, D. (2004). Protein Kinase C δ Activation Induces Apoptosis in Response to Cardiac Ischemia and Reperfusion Damage. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp.47985–47991.

Murry, C.E., Jennings, R.B. and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), pp.1124–1136.

Neckář, J., Svatoňová, A., Weissová, R., Drahota, Z., Zajíčková, P., Brabcová, I., Kolář, D., Alánová, P., Vašinová, J., Šilhavý, J., Hlaváčková, M., Tauchmannová, K., Milerová, M., Ošťádal, B., Červenka, L., Žurmanová, J., Kalous, M., Nováková, O., Novotný, J., Pravenec, M. and Kolář, F. (2017). Selective replacement of mitochondrial DNA increases the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science*, 131(9), pp.865–881.

*Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A. and Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504(1), pp.82–106.

Netticadan, T., Temsah, R., Osada, M. and Dhalla, N.S. (1999). Status of Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 277(3), pp.384–391.

Nguyen, M., Millars, D., Wee Yongll, V., Korsmeyedl, S. and Shores, G. (1993). Targeting of Bcl-2 to the Mitochondrial Outer Membrane by a COOH-terminal Signal Anchor Sequence*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(34), pp.25265–25268.

Nishihara, M., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Yano, T., Naitoh, K., Otori, K., Hotta, H., Terashima, Y. and Shimamoto, K. (2007). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3 β -mediated myocardial protection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 43(5), pp.564–570.

Nizielski, S.E., Billington, C.J. and Levine, A.S. (1995). Cold-induced alterations in uncoupling protein and its mRNA are seasonally dependent in ground squirrels. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 269(2), pp.357–364.

Nowikovsky, K., Schweyen, R.J. and Bernardi, P. (2009). Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: Potassium transport and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(5), pp.345–350.

Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., Teng, Y., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Allen, M., Springer, D.A., Aponte, A.M., Gucsek, M., Balaban, R.S., Murphy, E. and Finkel, T. (2013). The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Cell Biology*, 15(12), pp.1464–1472.

Pastorino, J.G., Hoek, J.B. and Shulga, N. (2005). Activation of Glycogen Synthase Kinase 3 β Disrupts the Binding of Hexokinase II to Mitochondria by Phosphorylating Voltage-Dependent Anion Channel and Potentiates Chemotherapy-Induced Cytotoxicity. *Cancer Research*, 65(22), pp.10545–10554.

Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Cung, T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., Macia, C., Raczka, F., Sportouch, C., Gahide, G., Finet, G., André-Fouët, X., Kirkorian, G., Monassier, J.-P., Derumeaux, G., Ovize, M., Lyon, B. and Lyon, P. (2008). Effect of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*, 359, pp.473–81.

Powers, S., Demirel, H., Vincent, H., Coombes, J., Naito, H., Hamilton, K., Shanely, A. and Jessup, J. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *American Journal of Physiology*, 275(44), pp.1468–1477.

Quindry, J., French, J., Hamilton, K., Lee, Y., Mehta, J. and Powers, S. (2005). Exercise training provides cardioprotection against ischemia–reperfusion induced apoptosis in young and old animals. *Experimental Gerontology*, 40(5), pp.416–425.

Rehni, A. and Dave, K. (2018). Ameliorative potential of conditioning on ischemia-reperfusion injury in diabetes. *Conditioning Medicine*, 1(3), pp.105–115.

Rey, G., Jouglu, E., Fouillet, A., Pavillon, G., Bessemoulin, P., Frayssinet, P., Clavel, J. and Hémon, D. (2007). The impact of major heat waves on all-cause and cause-specific mortality in France from 1971 to 2003. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(7), pp.615–626.

Robin, E., Guzy, R.D., Loor, G., Iwase, H., Waypa, G.B., Marks, J.D., Hoek, T.L.V. and Schumacker, P.T. (2007). Oxidant Stress during Simulated Ischemia Primes Cardiomyocytes for Cell Death during Reperfusion. *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), pp.19133–19143.

Rothwell, N.J. and Stock, M.J. (1981). Influence of noradrenaline on blood flow to brown adipose tissue in rats exhibiting diet-induced thermogenesis. *Pflungers Archiv: European Journal of Physiology*, 389(3), pp.237–242.

Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Miro-Casas, E., Abellan, A. and Soler-Soler, J. (2006). Mitochondrial Ca²⁺ uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. *Cardiovascular Research*, 71(4), pp.715–724.

Sato, T., Saito, T., Saegusa, N. and Nakaya, H. (2004). Mitochondrial Ca²⁺ Activated K Channels in Cardiac Myocytes A Mechanism of the Cardioprotective Effect and Modulation by Protein Kinase A. *Circulation*, 111, pp.198–203.

Serviddio, G., Di Venosa, N., Federici, A., D'Agostino, D., Rollo, T., Prigigallo, F., Altomare, E., Fiore, T. and Vendemiale, G. (2005). Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion. *The FASEB Journal*, 19(3), pp.354–361.

Shechtman, O., Papanek, P.E. and Fregly, M.J. (1990). Reversibility of cold-induced hypertension after removal of rats from cold. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(7), pp.830–835.

Sheth, T., Nair, C., Muller, J. and Yusuf, S. (1999). Increased winter mortality from acute myocardial infarction and stroke: the effect of age. *Journal of the American College of Cardiology*, 33(7), pp.1916–1919.

Shinmura, K., Tamaki, K., Sano, M., Nakashima-Kamimura, N., Wolf, A.M., Amo, T., Ohta, S., Katsumata, Y., Fukuda, K., Ishiwata, K., Suematsu, M. and Adachi, T. (2011). Caloric Restriction Primes Mitochondria for Ischemic Stress by Deacetylating Specific Mitochondrial Proteins of the Electron Transport Chain. *Circulation Research*, 109(4), pp.396–406.

da-Silva, W.S., Gómez-Puyou, A., de Gómez-Puyou, M.T., Moreno-Sanchez, R., De Felice, F.G., de Meis, L., Oliveira, M.F. and Galina, A. (2004). Mitochondrial Bound Hexokinase Activity as a Preventive Antioxidant Defense. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), pp.39846–39855.

*Slezak, J., Tribulova, N., Okruhlicova, L., Dhingra, R., Bajaj, A., Freed, D. and Singal, P. (2009). Hibernating myocardium: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 87, pp.252–265.

Smeele, K.M.A., Southworth, R., Wu, R., Xie, C., Nederlof, R., Warley, A., Nelson, J.K., van Horssen, P., van den Wijngaard, J.P., Heikkinen, S., Laakso, M., Koeman, A., Siebes, M., Eerbeek, O., Akar, F.G., Ardehali, H., Hollmann, M.W. and Zuurbier, C.J. (2011). Disruption of Hexokinase II–Mitochondrial Binding Blocks Ischemic Preconditioning and Causes Rapid Cardiac Necrosis. *Circulation Research*, 108(10), pp.1165–1169.

Strasser, R.H., Simonis, G., Schön, S.P., Braun, M.U., Ihl-Vahl, R., Weinbrenner, C., Marquetant, R. and Kübler, W. (1999). Two Distinct Mechanisms Mediate a Differential Regulation of Protein Kinase C Isozymes in Acute and Prolonged Myocardial Ischemia. *Circulation Research*, 85(1), pp.77–87.

Sun, L., Shukair, S., Naik, T.J., Moazed, F. and Ardehali, H. (2007). Glucose Phosphorylation and Mitochondrial Binding Are Required for the Protective Effects of Hexokinases I and II. *Molecular and Cellular Biology*, 28(3), pp.1007–1017.

Suzuki, K., Murtuza, B., Sammut, I., Latif, N., Jayakumar, J., Smolenski, R., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H. and Yacoub, M. (2002). Heat Shock Protein 72 Enhances Manganese Superoxide Dismutase Activity During Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury, Associated With Mitochondrial Protection and Apoptosis Reduction. *Circulation*, 106(1), pp.270–275

*Szabo, I. and Zoratti, M. (2014). Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More. *Physiological Reviews*, 94(2), pp.519–608.

Tanno, M., Kuno, A., Ishikawa, S., Miki, T., Kouzu, H., Yano, T., Murase, H., Tobisawa, T., Ogasawara, M., Horio, Y. and Miura, T. (2014). Translocation of Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β), a Trigger of Permeability Transition, Is Kinase Activity-dependent and Mediated by Interaction with Voltage-dependent Anion Channel 2 (VDAC2). *Journal of Biological Chemistry*, 289(42), pp.29285–29296.

Tedeschi, H. and Harris, D.L. (1958). Some observations on the photometric estimation of mitochondrial volume. *Biochimica et Biophysica Acta*, 28, pp.392–402.

Tibenska, V., Benesova, A., Vebr, P., Liptakova, A., Hejnová, L., Elsnicová, B., Drahota, Z., Hornikova, D., Galatík, F., Kolar, D., Vybiral, S., Alánová, P., Novotný, J., Kolar, F., Novakova, O. and Zurmanova, J.M. (2020). Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting β -adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling. *Journal of Applied Physiology*, 128(4), pp.1023–1032.

Tsibulnikov, S.Y., Maslov, L.N., Naryzhnaya, N.V., Ivanov, V.V., Bushov, Y.V., Voronkov, N.S., Jaggi, A.S., Zhang, Y. and Oeltgen, P.R. (2019). Impact of cold adaptation on cardiac tolerance to ischemia-reperfusion. Role of glucocorticoid and thyroid hormones. *General physiology and biophysics*, 38(03), pp.245–251.

Uemura, A., Naito, Y. and Matsubara, T. (2002). Dynamics of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II following acute myocardial ischemia—translocation and autophosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297(4), pp.997–1002.

Urthaler, F., Wolkowicz, P.E., Digerness, S.B., Harris, K.D. and Walker, A.A. (1997). MDL-28170, a membrane-permeant calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC ϵ proteolysis in reperfused ferret hearts. *Cardiovascular Research*, 35(1), pp.60–67.

Venard, R., Brèthes, D., Giraud, M.-F., Vaillier, J., Velours, J. and Haraux, F. (2003). Investigation of the Role and Mechanism of IF1 and STF1 Proteins, Twin Inhibitory Peptides Which Interact with the Yeast Mitochondrial ATP Synthase. *Biochemistry*, 42(24), pp.7626–7636.

Vila-Petroff, M., Salas, M.A., Said, M., Valverde, C.A., Sapia, L., Portiansky, E., Hajjar, R.J., Kranias, E.G., Mundiña-Weilenmann, C. and Mattiazzi, A. (2007). CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 73(4), pp.689–698.

Waskova-Arnostova, P., Elsnicova, B., Kasparova, D., Hornikova, D., Kolar, F., Novotny, J. and Zurmanova, J. (2015). Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric

hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. *Journal of Applied Physiology*, 119(12), pp.1487–1493.

Waskova-Arnostova, P., Kasparova, D., Elsnicova, B., Novotny, J., Neckar, J., Kolar, F. and Zurmanova, J. (2014). Chronic Hypoxia Enhances Expression and Activity of Mitochondrial Creatine Kinase and Hexokinase in the Rat Ventricular Myocardium. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(2), pp.310–320.

Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y.-J., Sepuri, N.B.V., Zhang, Q., Koeck, T., Derecka, M., Szczepanek, K., Szlag, M., Gornicka, A., Moh, A., Moghaddas, S., Chen, Q., Bobbili, S., Cichy, J., Dulak, J., Baker, D.P., Wolfman, A., Stuehr, D., Hassan, M.O., Fu, X.-Y., Avadhani, N., Drake, J.I., Fawcett, P., Lesnefsky, E.J. and Larner, A.C. (2009). Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. *Science*, 323(5915), pp.793–797.

Weidemann, M.J., Erdelt, H. and Klingenberg, M. (1970). Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria. Identification of Carrier Sites. *European Journal of Biochemistry*, 16(2), pp.313–335.

Xuan, Y.-T., Guo, Y., Han, H., Zhu, Y. and Bolli, R. (2001). An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), pp.9050–9055.

Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T. and Hori, M. (1999). Exercise Provides Direct Biphasic Cardioprotection via Manganese Superoxide Dismutase Activation. *Journal of Experimental Medicine*, 189(11), pp.1699–1706.

Yang, D., Guo, S., Zhang, T. and Li, H. (2009). Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling. *FEBS Letters*, 583(15), pp.2500–2506.

Yusof, M., Kamada, K., Kalogeris, T., Gaskin, F.S. and Korthuis, R.J. (2009). Hydrogen sulfide triggers late-phase preconditioning in postischemic small intestine by an NO-and p38 MAPK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(3), pp.868–876.

Zhao, J., Cannon, B. and Nedergaard, J. (1998). Thermogenesis is β 3-but not β 1-adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275(6), pp. 2002–2011.

Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A. and Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(2), pp.579–580

12. Přílohy

Příloha 1:

Izolační pufr (pH= 7,2)

250 mM Sacharosa (Mr = 342, 296 g/mol, Sigma Aldrich)

10 mM Trizma Base (Mr = 121,14 g/mol, Sigma Aldrich)

Swelling pufr (pH= 7,2)

125 mM Sacharosa (Mr = 342, 296 g/mol, Sigma Aldrich)

65 mM KCl (Mr = 74,551 g/mol, Sigma Aldrich)

10mM HEPES (Mr = 238,3012 g/mol, Sigma Aldrich)

Roztoky pro mitochondriální bobtnání

5 mM Sukcinát ($C_4H_6O_4$) (Mr 97,994 = g/mol, Sigma Aldrich)

100 mM Fosfát (H_3PO_4) (Mr 118,09 = g/mol, Sigma Aldrich)

Příloha 2:

Tabulka 1: Hmotnosti letních modelů chladové expozice/aklimace. Uvedeny jsou průměrné hmotnosti (s příslušnou směrodatnou odchylkou σ): těla zvířete (BW), pravé komory (RV), septa (S), levé komory (LV) a srdce (HW). Dále poměry RV/BW, LV/BW a HW/BW.

označení	BW[g]	RV [mg]	S[mg]	LV [mg]	HW [mg]	RV/BW	LV/BW	HW/BW
Ø KA	400,10	213,00	221,40	667,50	1101,90	0,53	1,67	2,75
σ	5,66	6,98	13,96	30,63	31,63	0,02	0,07	0,07
Ø 1D	387,80	203,60	184,60	654,20	1042,40	0,53	1,68	2,69
σ	6,88	6,19	13,84	23,79	16,43	0,02	0,03	0,03
Ø 3D	400,33	218,00	279,00	629,00	1126,00	0,55	1,57	2,82
σ	11,82	15,90	12,42	15,89	31,49	0,04	0,03	0,08
Ø 10D	374,17	217,00	259,75	590,00	1066,75	0,58	1,57	2,84
σ	2,74	12,11	11,59	34,23	34,40	0,03	0,10	0,11
Ø KCA	389,00	230,75	275,75	632,63	1139,13	0,60	1,65	2,97
σ	16,52	4,77	4,70	27,71	23,48	0,03	0,11	0,14
Ø CA	427,75	261,50	456,75	577,75	1296,00	0,61	1,36	3,05
σ	14,73	14,78	173,84	28,57	191,98	0,04	0,10	0,48

Tabulka 2: Hmotnosti zimních modelů chladové expozice/aklimace. Uvedeny jsou průměrné hmotnosti (s příslušnou směrodatnou odchylkou σ): těla zvířete (BW), pravé komory (RV), septa (S), levé komory (LV) a srdce (HW). Dále poměry RV/BW, LV/BW a HW/BW.

označení	BW[g]	RV[mg]	S[mg]	LV[mg]	HW[mg]	RV/BW	LV/BW	HW/BW
Ø KA	308,13	197,25	206,13	494,13	897,50	0,64	1,61	2,92
σ	4,39	4,88	5,60	22,62	23,08	0,02	0,09	0,10
Ø 1D	325,83	206,00	222,33	536,33	964,67	0,63	1,66	2,97
σ	11,80	16,61	10,50	9,51	33,24	0,03	0,06	0,07
Ø 3D	293,25	199,25	228,88	461,38	889,50	0,68	1,57	3,04
σ	3,03	5,86	13,84	11,37	12,84	0,02	0,04	0,06
Ø 10D	291,75	209,63	218,00	478,00	905,63	0,72	1,64	3,11
σ	2,09	4,58	8,97	19,29	14,36	0,02	0,07	0,06
Ø KCA	417,83	221,17	200,67	714,33	1136,17	0,53	1,72	2,72
σ	13,16	9,74	19,66	31,56	41,10	0,02	0,08	0,08
Ø CA	406,00	232,33	233,67	659,33	1125,33	0,57	1,63	2,78
σ	6,03	9,14	13,79	59,01	59,09	0,03	0,16	0,18